

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA ZOOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Genetická struktura středoevropských populací ježků  
*Erinaceus europaeus* a *E. roumanicus*

Genetic structure of Central European populations of  
hedgehogs *Erinaceus europaeus* and *E. roumanicus*

Barbora Bolfíková

Vedoucí práce: RNDr. Pavel Hulva, Ph.D.

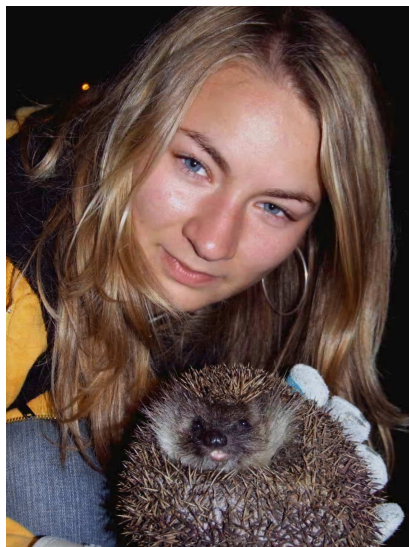
Praha 2009

Prohlašuji, že tato práce byla vypracována samostatně s použitím citované literatury, pod vedením školitele práce.

V Praze dne:1.9.2009

Barbora Bolfíková

## Poděkování



Na prvním místě bych chtěla poděkovat mému školiteli, RNDr. Pavlu Hulvovi, PhD., který opět projevil velkou dávku trpělivosti a obrovské úsilí při vzniku této práce. Bez něj by tento projekt, který byl nesmírně zajímavý a neméně obtížný již od svého počátku, nikdy nevznikl. Dostala jsem jedinečnou šanci pracovat samostatně a velkou mírou se podílet na celém nově vznikajícím projektu, což sebou neslo velké riziko a zodpovědnost .

Velký dík patří všem, kteří nám nezištně pomáhali se sběrem dat a často tak riskovali holé životy na silnicích. Neméně k této práci přispělo několik záchranných stanic a ekocenter, jejichž rad a zkušeností si velmi cením a doufám, že se naše spolupráce bude v budoucnu nadále rozvíjet. Pokud se někdo nenajde v seznamu dárců, uvedeném v práci, velmi se mu tímto omlouvám, jeho vzorky bohužel z nějakého důvodu nemohly být použity.

Chtěla bych vzpomenout i na rodinu, která asi ne vždy měla pochopení pro téma mého studia (chleba doopravdy levnější nebude), přesto trpělivě vše snášela a celou dobu mě všemi možnými způsoby podporovala. Jen díky nim, jsem zvládla tuto dlouhou cestu.

Chtěla bych poděkovat a částečně věnovat tuto práci člověku, který tady již není, ale jehož podpora byla nedílnou součástí celého mého života. Vděčím ji především za pouta a cit ke všemu živému, který, jak doufám, jsem zdédila.

Díky přátelům jsem si uchovala psychické zdraví a tak, však vy víte...

V tomto případě se příliš nehodí děkovat ježkům a už vůbec řidičům, přesto se z mého pohledu ježčí úhyny takto staly přece jen o něco méně zbytečnými.

Tato práce vznikla s finanční podporou výzkumného záměru MŠMT 0021620828

# Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
1. Úvod.....	7
1.1. Vliv glaciálů na genetickou strukturu západopalearktických druhů.....	7
1.2. Modelové druhy.....	8
1.2.1. <i>Melanargia lachesis</i> a <i>M. galathea</i> .....	8
1.2.2. <i>Chorthippus parallelus</i> .....	9
1.2.3. <i>Ursus arctos</i> .....	10
1.2.4. <i>Erinaceus europaeus</i> a <i>E. roumanicus</i> .....	10
1.3. Osídlení Evropy <i>E. europaeus</i> a <i>E. roumanicus</i> .....	12
1.4. Hybridizace a introgrese.....	14
2. Materiál a metody.....	16
2.1. Izolace DNA... ..	25
2.2. Kontrolní oblast mtDNA.....	25
2.2.1. PCR.....	25
2.2.2. Přečištění.....	26
2.3. Mikrosatelity. ....	26
2.3.1. PCR. ....	26
2.3.2. Fragmentační analýza.....	28
2.4. Analýza dat.....	28
2.4.1. Sekvence. ....	28
2.4.2. Mikrosatelity.....	30
3. Výsledky.....	33
3.1. Sekvence.....	33
3.2. Mikrosatelity.....	44
4. Diskuze.....	50
5. Literatura.....	56
6. Příloha.....	63

## Abstrakt

V České republice se nachází široká zóna sympatrického výskytu dvou druhů ježků - *Erinaceus europaeus* a *E. roumanicus*, která vznikla během Holocénu. Práce je založena na genetických datech zjištěných u 248 exemplářů, vzorkování bylo zaměřeno na oblast střední Evropy. Použili jsme 410 párů bazí dlouhou částečnou sekvenci kontrolního úseku mitochondriální DNA a 9 mikrosatelitových lokusů. Pomocí různých přístupů jsme se snažili odhalit detaily o rozšíření, populační strukturu, demografickou historii a případný genový tok mezi oběma druhy. V našich datech jsme zaznamenali signifikantně vyšší výskyt *E. europaeus* (až 3x) oproti *E. roumanicus* a posun hranic areálu obou druhů o desítky kilometrů za posledních 30 let. Genetická variabilita byla vyšší u *E. europaeus*. U *E. roumanicus* byla v datech podpora pro mírný populační nárůst, zatímco populační velikost *E. europaeus* se zdá být stabilní. U některých lokusů byly zjištěny odchylky od Hardy-Weinbergerovy rovnováhy, které mohou být způsobeny Wahlundovým efektem. Nejistili jsme přítomnost hybridizace a introgrese, mezi druhy zřejmě došlo k vytvoření úplných prekopulačních reprodukčně izolačních bariér.

**Klíčová slova:** *Erinaceus europaeus*, *Erinaceus roumanicus*, populační struktura, střední Evropa, kontaktní zóna, mikrosatelity, kontrolní oblast mtDNA

## Abstract

In the Czech Republic there is a wide zone of sympatric occurrence of two hedgehog species – *Erinaceus europaeus* and *E. roumanicus*, which is of Holocene origin. This work is based on genetic data obtained in 248 specimens, the sampling was focused on the area of Central Europe. We have used 410 bp long partial sequence of mtDNA control region and 9 microsatellite loci. With aid of different methods, we attempted to reveal details of distributions, population structure, demographic history and potential gene flow between both species. We have detected significantly higher occurrence of *E. europaeus* (3 times) compared to *E. roumanicus* and the shift of range borders in scale of tens of kilometers in last 30 years. Genetic variability was higher in *E. europaeus*. In *E. roumanicus*, there was support for moderate population increase, while the population size in *E. europaeus* seems to be stable. We have detected deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in some loci, which could be ascribed to the Wahlund effect. We did not detect existence of hybridization or introgression, the complete precopulatory reproductive barriers have been formed supposedly.

**Key words:** *Erinaceus europaeus*, *Erinaceus roumanicus*, population structure, Central Europe, contact zone, microsatellites, mtDNA control region

# 1. Úvod

## 1.1 Vliv glaciálů na genetickou strukturu západopalearktických druhů

Klimatické změny v Pleistocénu měly značný dopad na distribuci a evoluci jednotlivých druhů fauny i flóry. Tato doba je charakteristická opakovanými glaciálními cykly, kdy došlo k snížení zemské teploty a nárůstu ledovců. Díky zadržování vody v ledovcích docházelo ke snižování hladin moří a docházelo tak k tvorbě pevninských mostů, kudy mohli migrovat někteří živočichové (Hofreiter & Stewart 2009). Poslední doba ledová proběhla v období před 110-12 tis. lety, s maximem před 18 tis. lety (Hewitt 2000).

Takovéto globální fluktuace klimatu se dají zkoumat z různých zdrojů - např. z nitra mořského dna, ze dna jezer, z ledovců, kde se dají zanalyzovat izotopy uhlíku a kyslíku, z radiolariového bahna z moří, tvořených mřížovci (Radiozoa), z pylových analýz a dalších biologických a fyzikálních znaků (Bennett 1997, Williams et al. 1998).

Dopady těchto událostí jsou zvláště patrné v oblasti západní Palearktidy. Vzhledem k západo-východní orientaci Evropy představuje Středozemní moře na jihu významnou bariéru pro přesun druhů ze severu na jih během dob ledových. Také Alpy a Pyreneje, díky své západo-východní orientaci, mohly být značnou bariérou pro opětovnou expanzi na sever během interglaciálů (Schmitt 2009).

Během čtvrtohor mnoho druhů prošlo řadou změn areálu. Při nástupu chladnějšího klimatu a postupu ledovce vyhynuly severní populace a některé druhy přežívaly pouze v jižních refugiích, což vedlo k rozpadu areálů a v některých případech až k alopatrické speciaci. Při oteplování v interglaciálu docházelo k severním expanzím z refugií. Tyto expanze byly doprovázeny sérií bottle-necků a mohly vést ke ztrátě genetické diverzity u severních populací (Hewitt 2000, Hofreiter & Stewart 2009).

Rozšíření savců, obývajících mediteránní oblasti a mírné klima, často korelovalo s distribucí lesa během glaciálních a interglaciálních cyklů (Hewitt 1996). Areály mnoha druhů živočichů byly opakovaně zatlačeny do malých refugií během posledního glaciálního maxima a mladšího Dryasu. Za tři základní Pleistocenní refugia v Evropě jsou považovány Iberský, Apeninský a Balkánský poloostrov (Hewitt 2000, Hewitt 2001).

Opakované cykly expanzí a zmenšování areálů zanechaly genetický signál v genomech organismů a v genetické struktuře jejich populací (např. Avis et al. 1987). Dnes jsou někdy blízké příbuzné populace geneticky rozděleny do skupin vikariantních druhů

vníklých v alopatrii, poddruhů nebo ekotypů, které se vytvořily v glaciálních refugiích. Postglaciální demografická expanze vyústila v parapatrickou distribuci a někdy mohlo dojít i k druhotnému kontaktu až sympatrickému překryvu takto oddělených linií (Hewitt 2001).

Téměř všechny Evropské druhy mediteránního původu měly během glaciálu refugium alespoň v jednom ze tří Evropských mediteránních poloostrovů (Iberský, Apeninský, Balkánský), a většina těch druhů, které jsou recentně nejvíce rozšířené, měla refugium na všech třech poloostrovech. Postglaciální expanze byla u těchto druhů ovlivněna Alpami a Pyrenejemi, jakožto významnými bariérami při šíření na sever (Schmitt 2009).

Fylogeografie využívá molekulární a geografická data k odhalení role historických faktorů v současné distribuci biodiverzity (Avice 2000). Fylogenetická a geografická distribuce variability genomů může být zkoumána pomocí vhodných genetických markerů, jako jsou sekvence různých mitochondriálních a jaderných lokusů, délky mikrosatelitových alel aj. Většina DNA sekvencí (mimo variabilních oblastí mtDNA a mikrosatelitů) neměla dostatek času pro větší divergenci během čtvrtohor a během Holocénu tak mohlo být vygenerováno jen velmi málo nových haplotypů.

## 1.2 Modelové druhy

Přestože každý druh má svou jedinečnou historii a vlastní způsoby rekolonizace Evropy, ve vývoji názorů na způsoby postglaciální expanze sehrály důležitou roli některé modelové druhy (viz např. Hewitt 2000, Schmitt 2007). Základní paradigmaty (spojená s divergencemi mediteránního původu a existencí tří hlavních jihoevropských refugií) jsou postupně doplňována znalostmi o severních refugiích (např. *Clethrionomys glareolus*, Deffontaine et al. 2005), o vlivu několikanásobných expanzí z refugií (*Vipera berus*, Ursenbach et al. 2006), o situaci u druhů kontinentálního původu nebo s arктоalpinským výskytem apod.

### 1.2.1 *Melanargia lachesis* a *M. galathea*

Jeden z typických způsobů distribuce byl poprvé zkoumán u motýla *Melanargia lachesis* s výskytem ve Španělsku a Portugalsku a *M. galathea*, který se vyskytuje v celé Evropě a severní Africe. Byly nalezeny tři mitochondriální linie, odpovídající třem hlavním jižním refugiím během doby ledové. Zatímco *M. galathea* s refugii na Apeninském a



Balkánském poloostrově zpětně osídlil celou Evropu, *M. lachesis* nepřekonal Pyreneje a jeho výskyt je omezen na Iberský poloostrov (Habet et al. 2005).

Podobný typ rekolonizace sdílí další druhy motýlů, např. *Polyommatus coridon* a *P. hispana* (Schmitt & Seitz 2001).

### 1.2.2 *Chorthippus parallelus*

U sarančete stěhovavého (*Chorthippus parallelus*) byly analyzovány jaderné nekódující sekvence, které odhalily, že genom toho druhu je rozdělen do nejméně pěti geograficky lokalizovaných klastrů. Haplotypy ze severní Evropy se ukázaly jako málo diverzifikované a byly blízce příbuzné haplotypům z Balkánského poloostrova, což naznačuje expanzi právě z Balkánského refugia. Turecko, Řecko, Španělsko a Itálie vykazovaly velkou míru unikátních haplotypů, což naznačuje polohu refugií v těchto jižních oblastech, kde byly populace po dobu glaciálu (Cooper et al. 1995). Hybridní zóna byla popsána mezi Španělskou a Francouzskou linií a mezi Italskou a Francouzsko-Rakouskou linií podél Pyrenejí a Alp, kde se tyto geneticky oddělené linie setkávají (Flanagan et al. 1999)

Podobný pattern expanze z Balkánského poloostrova vykazují i jiné druhy, např. olše lepkavá (*Alnus glutinosa*, King & Ferris 1998), buk lesní (*Fagus sylvatica*, Demesure et al. 1996) a čolek velký (*Triturus cristatus*, Wallis & Arntzen 1989).



**Obr. 1.** Postglaciální cesty *Chorthippus parallelus* z jižních refugií (Hewitt 2000).

### 1.2.3 *Ursus arctos*

Medvěd hnědý (*Ursus arctos*) byl hojně rozšířený druh, ale jeho stavy byly značně zredukovány lidmi a v současné době se nachází jen v omezených oblastech hlavně na východě Evropy a ve Skandinávii. Analýza mtDNA ukázala oddělenou východní a západní linii (Taberlet & Bouvet 1994). Medvěd kolonizoval Evropu z Iberského refugia a z oblasti východního palearktu, kde přesná poloha refugia není přesně známa. Starší analýzy odhadovaly jeho polohu u Kavkazu a Karpat, ale po přidání nových jedinců z dalších částí areálu se zdá, že toho refugium bylo až za Uralem (Korsten et al. 2009). Tyto dvě mitochondriální linie se setkávají ve středním Švédsku, kde vznikla hybridní zóna.



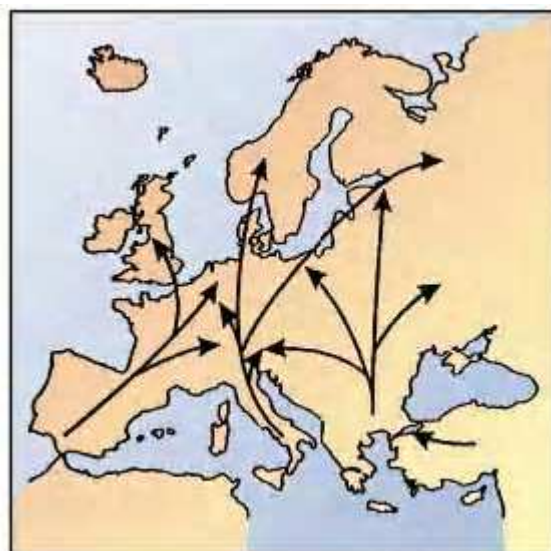
**Obr. 2.** Postglaciální cesty *Ursus arctos* z jižních refugií (Hewitt 2000).

Podobnou historii šíření z refugií mají např. poletuška slovanská (*Pteromys volans*, Oshida et al. 2005), hraboš mokřadní (*Microtus agrestis*, Jaarola & Searle 2002) a rejsek obecný (*Sorex araneus*, Taberlet 1994).

### 1.2.4 *Erinaceus europaeus* a *E. roumanicus*

Jedním z modelových druhů fylogeografie západního Palearktu jsou právě ježci. První studie proběhly pomocí mitochondriálních markerů, které odhalily přítomnost několika mitochondriálních linií (Santucci et al. 1998, Seddon et al. 2001). *E. europaeus* zahrnoval 3 monofyletické linie s označením: E1 (Itálie, Rakousko, Švýcarsko, Německo, Nizozemí, Skandinávie a Estonsko), E2 (Španělsko, Portugalsko, Francie, Nizozemí, Velká Británie a Irsko) a E3 (Sicílie). *E. concolor* obsahoval linie pouze dvě, s označením: C1 (dnes *E. roumanicus* - Turecko, Řecko, Rusko, Polsko, Maďarsko, Chorvatsko a Srbsko) a C2 (dnes *E. concolor* - Turecko a Izrael). Vznik a rozšíření linií E1, E2 a C1 se dá korelovat s existencí jižních refugií a s kolonizací Evropy z těchto oblastí. Mitotypy z Izraele a Turecka byly velmi odlišné od zbytku tehdejšího druhu *E. concolor* (zahrnujícího i *E. roumanicus*). Oddělení těchto mitotypů vzniklo zřejmě během více glaciálních cyklů a historie refugií byla komplexnější. Jižní Kavkaz mohl obsahovat více refugií nebo menší fragmentované populace (Seddon et al. 2002).

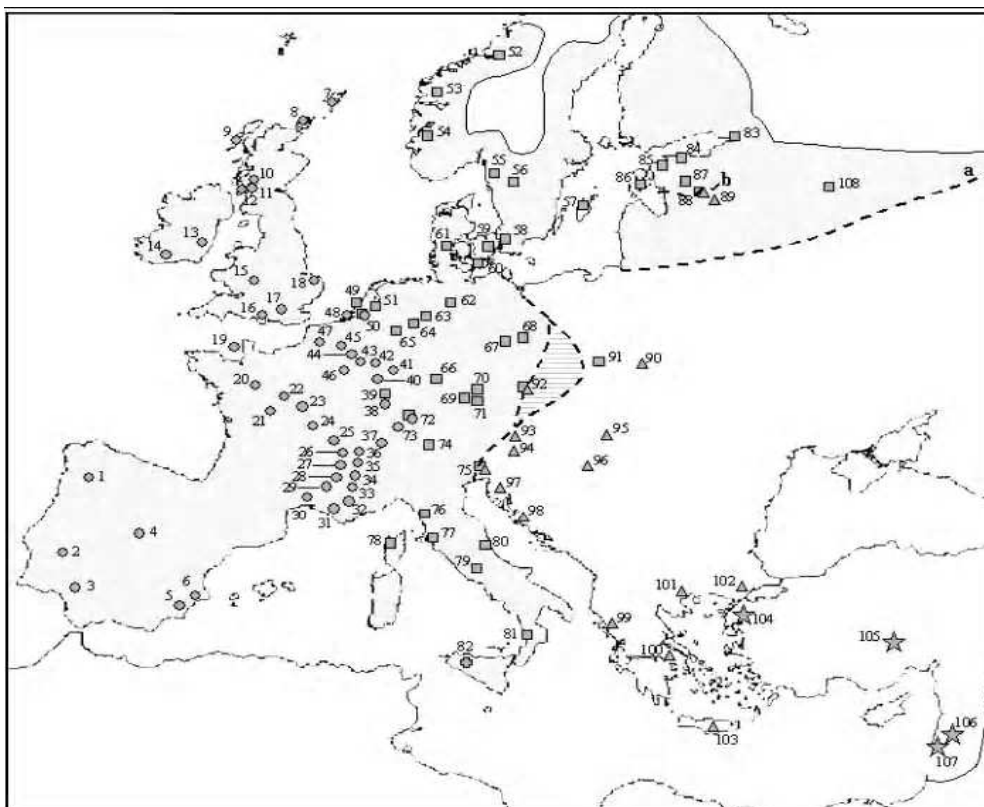
Podle molekulárního datování proběhla poslední expanze z glaciálních refugií přibližně před 16 000 lety. Předpokladem je starší, pre-Pleistocénní oddělení *E. europaeus* a *E. roumanicus* (3,2-4,5 mil. let). Tato doba by v porovnání s mutační rychlostí nestačila k vytvoření tak velké variability v mitotypech, jakou můžeme pozorovat dnes. Předpokládá se proto existence izolovaných populací v refugiích, které vedly k větší diferenciaci mitotypů.



**Obr. 3.** Postglaciální cesty *Erinaceus europaeus* a *E. roumanicus* z jižních refugií (Hewitt 2000).

Studie jaderných genů podpořily druhový status *E. roumanicus* (Seddon et al. 2001, Seddon et al. 2002, Berggren et al. 2005). Nepotvrdily se mitochondriální linie E1, E2 a E3, zato C1 a C2 zůstaly odděleny. Tyto dva klastry jsou od sebe striktně izolovány i geograficky - na západě Bosporskou úžinou a na východě pohořím Kavkazu. Tato distribuce a zmíněné geografické bariéry značně ztěžují kontakt obou linií a naznačují oddělenou refugiální minulost i odlišné cesty rekolonizace. Hlubším studiem rozdílů mezi těmito druhy byly objeveny výrazné odlišnosti v morfologii crania a v karyologii (Arslan et al. 2008, Bannikova 2003, Kryštůfek 2001).

Díky zmíněným genetickým analýzám bylo zjištěno, že genomový pool západopalearktických ježků je strukturován do tří severojižně orientovaných pruhů a čtvrtý klastér pochází z Turecka a Izraele. Tento pattern pomohl odhalit tři důležitá refugia Evropské fauny a flóry: západní - Iberské, centrální - Apeninské a východní – Balkánské. Tuto hypotézu podporují i pylové a klimatologické studie (Hewitt 2000). Na území střední Evropy se v recentu setkaly rekolonizační cesty druhu *E. europaeus* a *E. roumanicus*. V tomto ohledu je velmi výhodné postavení České republiky, která leží v centru Evropy, na křižovatce těchto cest.



**Obr. 4.** Rozložení mitochondriálních linií v Evropě. Šedě je vyznačen areál *E. europaeus* a bílá část zahrnuje *E. roumanicus* a *E. concolor*. *E. europaeus*: kruh = linie E2, čtverec = linie E1, kříž = linie E3. *E. roumanicus*: trojúhelník = linie C1. *E. concolor*: hvězda = linie C2. (Seddon et al. 2001).

### 1.3 Osídlení Evropy *E. europaeus* a *E. roumanicus*

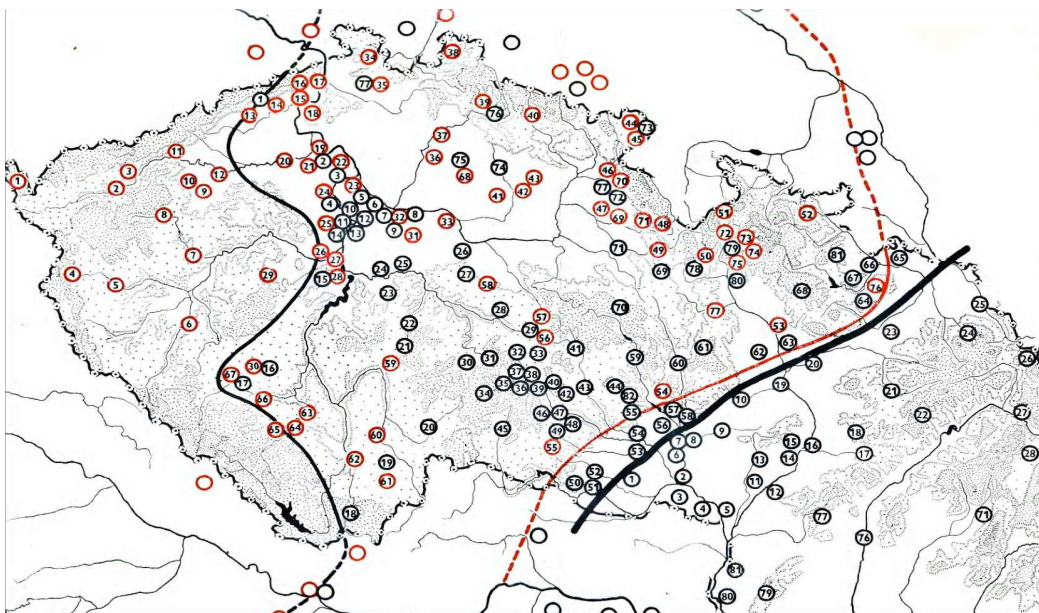
*E. europaeus* se poprvé objevil v severní a střední Evropě v raném Holocénu (cca před 11000 lety). Subfossilní data z Velké Británie (Coard & Chamberlain 1999) naznačují, že se tam již vyskytoval na přelomu pre-Boreálu a Boreálu (před 10-11 000 lety). V ostatních částech západní Evropy se poprvé vyskytuje v Boreálu, v Německu (Gramsch 2000) jsou první nálezy z raného a středního Boreálu (před 10000 lety). Z Atlantiku (před 9000 lety) jsou záznamy z České republiky a Estonska. Záznamy od Atlantiku dál jsou evidovány v celém současném areálu rozšíření (Sommer 2006).

*E. roumanicus* se v Holocenních subfossilních záznamech objevuje velmi zřídka, pouze v Řecku jsou nálezy z několika jeskyní, z raného Holocénu. V oblastech současného západního výskytu, jsou první záznamy z pozdního Atlantiku (Sommer 2006). Chybí však bližší data pro tento druh a malé N v paleontologických studiích neumožňuje hlubší pohled na historii kolonizace *E. roumanicus*.

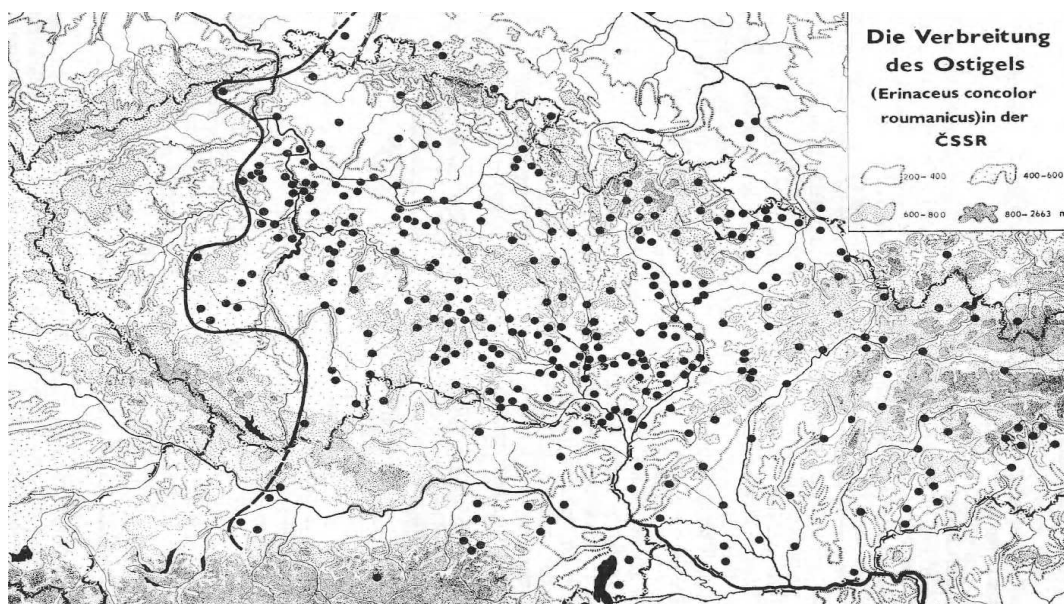


Severně od Alp (západní Polsko, Česká republika, severní Rakousko) se oba druhy dostaly do kontaktu přibližně v Boreálu, soudě podle subfossilního záznamu pro *E. europaeus*. V severní Itálii muselo dojít ke styku hranic areálu mnohem dřív, vzhledem ke krátké vzdálenosti mezi refugii. I přes nedostatek fosilních dat autoři soudí, že *E. roumanicus* dosáhl svého východního limitu areálu v Boreálu, a to podle dat pro *E. europaeus*, jehož rozšíření v té době mohlo být východněji než dnes (Sommer 2006).

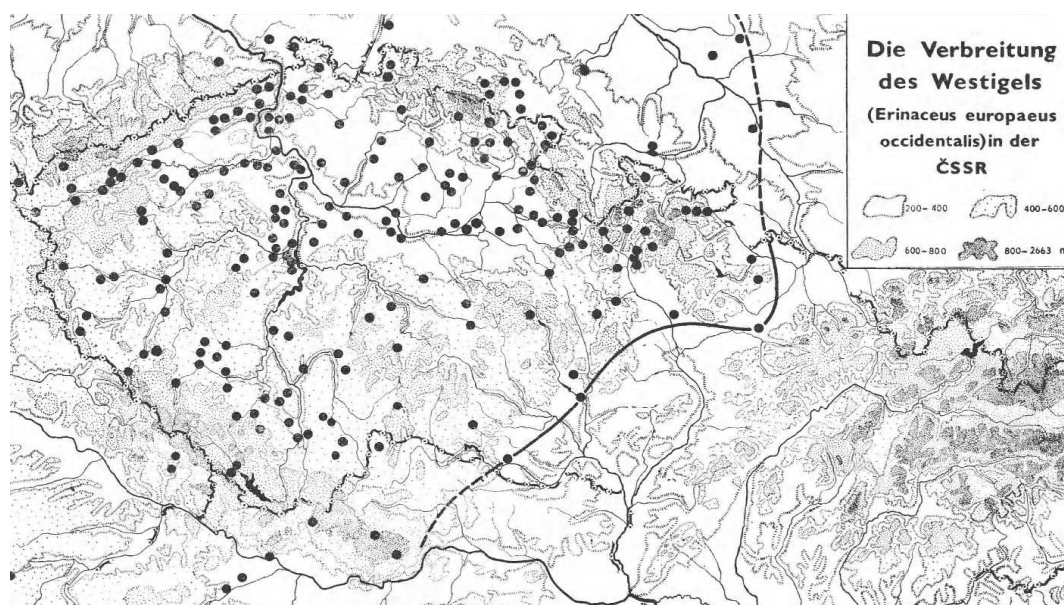
V současné době je areál obou druhů přibližně parapatrický, s výraznou sympatrickou zónou v Polsku, České republice, Rakousku a Itálii. První faunistické práce, věnující se zóně kontaktu v České republice jsou z let 1966 a 1975 (obr. 5; 6; 7), kde byly označeny hranice areálu obou druhů a zaznamenán částečný posun během těchto let (Kratochvíl 1966, 1975). Autor se domnívá, že *E. europaeus* osídlil hercynskou část České republiky mnohem dříve než *E. roumanicus*, který osídlil část karpatskou. Mezi oběma druhy existovala přirozená hranice tvořena masivem lesů západních Karpat a bažinnou oblastí v dolním povodí Moravy a přilehlé části Dunaje. Zkulturnění této krajiny v historicky nedávné době zrušilo tuto přirozenou bariéru mezi oběma druhy a mohlo otevřít cestu nástupu *E. roumanicus* z karpatské části na západ do areálu *E. europaeus* (Kratochvíl 1966). Kratochvíl dále označuje nejvýchodnější výskyt *E. europaeus* za ústupová výskytisť, tedy za zbytky souvislého rozšíření v této oblasti, a nejzápadnější výskyt *E. roumanicus* za předsunutá výskytisť.



**Obr. 5.** Výskyt *E. europaeus* (červeně) a *E. roumanicus* (černě) na území České republiky v roce 1966 (Kratochvíl 1966)



**Obr. 6.** Výskyt *E. roumanicus* na území České republiky v roce 1975 (Kratochvíl 1975).



**Obr. 7.** Výskyt *E. europaeus* na území České republiky v roce 1975 (Kratochvíl 1975).

#### 1.4 Hybridizace a introgrese

Otázka hybridizace již byla v minulosti řešena, a protože se podařilo zkřížit ježky v zajetí (Herter 1965, Poduschka & Poduschka, 1983), není vyloučeno, že by se kříženci mohli vyskytovat i ve volné přírodě. Poduschka & Poduschka (1983) dosáhli  $F_1$  generace, kterou zpětně křížili s rodičovskými druhy. Podařilo se to pouze s *E. roumanicus*, zpětné křížení s *E. europaeus* bylo neúspěšné. Vzhledem k absenci dat o hybridizaci a introgresi z

volné přírody zatím není jasné, jestli by tento jev mohl hrát roli při asymetrické expanzi obou areálů. Neschopnost zpětného křížení hybridů s *E. europaeus* by mohla teoreticky přispět k rychlejšímu rozšiřování areálu *E. roumanicus* (Reeve 1994). Pomocí alozymových dat však nebyla introgrese u 90 jedinců v Rakousku a ve východním Německu zaznamenána (Suchentrunk et al. 1997). V České republice neproběhly studie zaměřující se na hybridizaci, přesto se někteří autoři domnívají, že k ní může docházet (např. Anděra & Horáček 2005).

## **2. Materiál a metody**

Sběr dat probíhal v sezónách 2007, 2008 a 2009. Tkáňové vzorky obou druhů byly získávány z jedinců přejetých na silnicích a z uhynulých jedinců ze záchranných stanic a ekocenter. Spolupracovali jsme s osmi stanicemi (ZS Bartošovice, FALCO Dolní Týnec, ZS Zdeny Dvorské, Zoo Chomutov, Zoo Olomouc, SOP Pasíčka, ZS Pavlov, ekocentrum Vlašim, ekocentrum Spálené poříčí).

Odebraný vzorek tkáně (nejčastěji ucho, sval, prst, chlupové folikuly apod.) byl fixován v 96% etanolu a pro každý exemplář byla zaznamenána lokalita a datum sběru. Vzorkování bylo zaměřeno na oblast střední Evropy, do analýz byly zařazeny i referenční vzorky ze všech hlavních glaciálních refugií. Oblast Prahy byla vzorkována podrobněji. Celkem byl získán materiál z 248 jedinců ježků z České republiky, Německa, Francie, Portugalska, Sicílie, Slovenska, Bulharska, Rumunska, Řecka, Turecka a Libanonu.



druh	kód	lokality	datum	sběr	haplotyp	mikrosatelity
<i>E. concolor</i>	lbn	Libanon	2008	Horáček Ivan	EC01	ano
<i>E. concolor</i>	trc4	Turecko - Akseki	10.8.2007	Gvoždík Václav	EC02	ano
<i>E. europaeus</i>	11	Beřovice U Slaného	6.5.2007	Lučan Radek	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	45	Žleby	30.8.2007	Kaftan Milan, Švátora Miroslav	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	60	Litoměřice	2007	Falco Dolní Týnec	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	62	Litoměřice	2007	Falco Dolní Týnec	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	63	Litoměřice	2007	Falco Dolní Týnec	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	87	Chocerady	28.10.2007	ekocentrum Vlašim	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	103	Jičín-Sedlčický	7.7.2008	Šandera Martin	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	105	Miřetice u Hlinska v Čechách	15.11.2007	ZS Pavlov	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	109	Hustopeče (Břeclav)	3.6.2208	Pithartová Tereza	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	122	Praha-Trója	24.5.2008	Pithartová Tereza	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	130	Holé vrchy (Mladá Boleslav)	8.7.2008	Bolíková Barbora	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	137	Olomouc	2008	Zoo Olomouc	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	165	Štětí	16.9.2008	ZS Falco Dolní Týnec	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	166	Roudnice nad Labem	6.11.2008	ZS Falco Dolní Týnec	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	167	Česká Lípa	16.11.2008	ZS Falco Dolní Týnec	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	169	Doksy u České Lípy	10.10.2008	ZS Falco Dolní Týnec	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	187	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	203	Olomouc	2008	Zoo Olomouc	EE01	ano
<i>E. europaeus</i>	75	Praha, sídliště Petrovice	7.4.2008	Baláž Vojto	EE01	
<i>E. europaeus</i>	143	Horní Lhota	10.8.2008	Gvoždík Václav	EE01	
<i>E. europaeus</i>	172	Havlíčkův Brod	8.12.2008	ZS Pavlov	EE01	
<i>E. europaeus</i>	19	Liběchov	22.5.2007	Gvoždík Václav	EE02	ano
<i>E. europaeus</i>	36	Ostrava-Svinov	15.7.2007	Bolíková Barbora	EE02	ano
<i>E. europaeus</i>	48	Ostrava-Svinov	25.9.2007	Bolíková Barbora	EE02	ano
<i>E. europaeus</i>	61	Litoměřice	2007	Falco Dolní Týnec	EE02	ano
<i>E. europaeus</i>	66	Litoměřice	2007	Falco Dolní Týnec	EE02	ano
<i>E. europaeus</i>	68	Frydek Místek	12.12.2007	ZS Bartošovice	EE02	ano

<i>E. europaeus</i>	<b>69</b>	Rožnov pod Radhoštěm	5.11.2007	ZS Bartošovice	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>74</b>	Opava	20.12.2007	ZS Bartošovice	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>77</b>	Tábor	7.4.2008	Dvorská Zdena	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>83</b>	Praha 9	7.4.2008	Dvorská Zdena	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>93</b>	Počátky	7.10.2007	ZS Vlašim	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>95</b>	Ostrava-Svinov	25.4.2008	Bolíková Barbora	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>134</b>	Olomouc	2008	Zoo Olomouc	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>145</b>	Hluboká nad Vltavou	1.9.2008	Brandl Pavel, Kolářková Karolína	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>146</b>	Velké Meziříčí	1.8.2008	ZS Pavlov	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>150</b>	Golčův Jeníkov	1.9.2008	ZS Pavlov	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>151</b>	Golčův Jeníkov	1.9.2008	ZS Pavlov	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>152</b>	Golčův Jeníkov	1.9.2008	ZS Pavlov	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>153</b>	Golčův Jeníkov	1.9.2008	ZS Pavlov	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>154</b>	Golčův Jeníkov	1.9.2008	ZS Pavlov	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>155</b>	Bochov	3.6.2008	Příšová	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>182</b>	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>188</b>	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>211</b>	Klimkovice	1.11.2008	ZS Bartošovice	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>213</b>	Klimkovice	29.10.2008	ZS Bartošovice	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger449</b>	Badensko-Wuerttembersko-Stocksberg		Petney Trevor	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger450</b>	Badensko-Wuerttembersko-Stocksberg		Petney Trevor	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger452</b>	Badensko-Wuerttembersko-Karlsruhe		Petney Trevor	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger453</b>	Hamburk	2008	Petney Trevor	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger456</b>	Hesse-Brachtal	2008	Petney Trevor	<b>EE02</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>65</b>	Litoměřice	2007	Falco Dolní Týnec	<b>EE02</b>	
<i>E. europaeus</i>	<b>175</b>	Ledeč nad Sázavou	22.10.2008	ZS Pavlov	<b>EE02</b>	
<i>E. europaeus</i>	<b>2</b>	Praha-Kunratice	26.4.2007	Bolíková Barbora, Hulva Pavel, Kaftan Milan	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>3</b>	Jesenice-Horní Říčany	26.4.2007	Bolíková Barbora, Hulva Pavel, Kaftan Milan	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>31</b>	Keřkov	2.6.2007	Horáček Ivan	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>33</b>	Vsetín	17.6.2007	Šobotník Jan	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>34</b>	Paskov	14.7.2007	Bolíková Barbora	<b>EE03</b>	ano

<i>E. europaeus</i>	<b>40</b>	Praha-Koleje Jižní Město	16.7.2007	Schneiderová Irena	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>41</b>	Praha-Koleje Jižní Město	20.7.2007	Schneiderová Irena	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>67</b>	Ostrava-Hrabová	28.10.2007	ZS Bartošovice	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>70</b>	Studenka	24.1.2008	ZS Bartošovice	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>78</b>	Benešov	7.4.2008	Dvorská Zdena	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>86</b>	Kolín	7.4.2008	Dvorská Zdena	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>90</b>	Kamenice	20.10.2007	ekocentrum Vlašim	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>94</b>	Senohraby	5.11.2007	ekocentrum Vlašim	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>127</b>	Trutnov	2008	Dvorská Zdena	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>140</b>	Staré město (Uherské Hradiště)	2008	Baláž Vojto	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>161</b>	Nový Bor	6.9.2008	Falco Dolní Týnec	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>162</b>	Děčín - Březiny	3.8.2008	Falco Dolní Týnec	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>204</b>	Olomouc	2008	Zoo Olomouc	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>205</b>	Olomouc	2008	Zoo Olomouc	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>210</b>	Sedlnice	28.11.2008	ZS Bartošovice	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>215</b>	Český Těšín	1.12.2008	ZS Bartošovice	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>217</b>	Olomouc	2009	Zoo Olomouc	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>218</b>	Olomouc	2009	Zoo Olomouc	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger447</b>	Hamburk	2008	Petney Trevor	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger455</b>	Hesse-Maintal	2008	Petney Trevor	<b>EE03</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>136</b>	Olomouc	2008	Zoo Olomouc	<b>EE03</b>	
<i>E. europaeus</i>	<b>ger444</b>	Hamburk	2008	Petney Trevor	<b>EE04</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger439</b>	Hamburk	2008	Petney Trevor	<b>EE05</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger446</b>	Hamburk	2008	Petney Trevor	<b>EE05</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger445</b>	Hesse-Frankfurt	2008	Petney Trevor	<b>EE06</b>	
<i>E. europaeus</i>	<b>159</b>	Sokolov	20.7.2008	Průšová	<b>EE07</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>192</b>	Spálené Poříčí	29.2.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	<b>EE07</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger454</b>	Hamburk	2008	Petney Trevor	<b>EE07</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger436</b>	Bavorsko - Mnichov	2008	Petney Trevor	<b>EE08</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger438</b>	Bavorsko - Mnichov	2008	Petney Trevor	<b>EE09</b>	
<i>E. europaeus</i>	<b>4</b>	Jesenice-Horní Řičany	26.4.2007	Bořtková Barbora, Hulva Pavel, Kaftan Milan	<b>EE10</b>	ano

<i>E. europaeus</i>	15	Dolní Věstonice	31.5.2007	Hulva Pavel, Horáček Ivan	EE10	ano
<i>E. europaeus</i>	73	Kopřivnice	19.2.2008	ZS Bartošovice	EE10	ano
<i>E. europaeus</i>	79	Zadní Třebáň	7.4.2008	Dvorská Zdena	EE10	ano
<i>E. europaeus</i>	97	Pavlice	25.4.2008	Reiter Antonín	EE10	ano
<i>E. europaeus</i>	108	Praha-Kbely	24.6.2008	Pihartová Tereza	EE10	ano
<i>E. europaeus</i>	148	Havlíčkův Brod	1.9.2008	ZS Pavlov	EE10	ano
<i>E. europaeus</i>	163	Louny	12.9.2008	Falco Dolní Týnec	EE10	ano
<i>E. europaeus</i>	170	Ledeč nad Sázavou	4.11.2008	ZS Pavlov	EE10	
<i>E. europaeus</i>	173	Ždírec nad Doubravou	13.9.2008	ZS Pavlov	EE10	
<i>E. europaeus</i>	174	Ždírec nad Doubravou	13.9.2008	ZS Pavlov	EE10	
<i>E. europaeus</i>	20	Praha-Kaletáňka	7.6.2007	Bolíková Barbora	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	88	Chrást	20.10.2007	ekocentrum Vlašim	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	91	Říčany	1.11.2007	ekocentrum Vlašim	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	92	Popovičky	1.11.2007	ekocentrum Vlašim	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	100	Pičín	25.5.2008	Šmíd Jiří	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	110	Praha-Bohnice	3.6.2008	Pihartová Tereza	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	120	Praha-Čimice	16.6.2008	Pihartová Tereza	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	156	Bochov	3.6.2008	Prušová	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	190	Blovice	29.1.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	194	Stod	12.10.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	195	Klatovy	3.11.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	196	Spálené Poříčí	26.11.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	EE11	ano
<i>E. europaeus</i>	171	Havlíčkův Brod	28.10.2008	ZS Pavlov	EE11	
<i>E. europaeus</i>	ger448	Badensko-Wuerttembergsko-Karlsruhe		Petney Trevor	EE12	ano
<i>E. europaeus</i>	157	Karlovy Vary	19.5.2008	Prušová	EE13	ano
<i>E. europaeus</i>	181	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	EE13	ano
<i>E. europaeus</i>	158	Karlovy Vary - Rybař	19.5.2008	Prušová	EE13	
<i>E. europaeus</i>	178	Praha-Řáblice	2008	Vodíčka Roman	EE13	
<i>E. europaeus</i>	35	Paskov	14.7.2007	Bolíková Barbora	EE14	ano
<i>E. europaeus</i>	71	Ostrava-Vítkovice	4.12.2007	ZS Bartošovice	EE14	ano
<i>E. europaeus</i>	72	Ostrava	4.12.2007	ZS Bartošovice	EE14	ano

<i>E. europaeus</i>	<b>138</b>	Olomouc	2008	Zoo Olomouc	<b>EE14</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>141</b>	Staré město (Uherské Hradiště)	2008	Baláz Vojto	<b>EE14</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>160</b>	Český Těšín	27.11.2008	Hulva Pavel	<b>EE14</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>208</b>	Valašské Meziříčí	18.4.2009	Bořiková Barbora, Hulva Pavel, Mikulěnka Ruda	<b>EE14</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>212</b>	Orlová	23.10.2008	ZS Bartošovice	<b>EE14</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>sk18</b>	Slovensko, Šaštín - Stráže	2009		<b>EE14</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>37</b>	Sokolov	14.7.2007	Schneiderová Irena	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>38</b>	Sokolov-Michal	16.7.2007	Leden David	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>39</b>	Sokolov-Michal	16.7.2007	Leden David	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>42</b>	Praha-Nové Butovice	12.6.2007	Gvoždík Václav	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>51</b>	Karlovy Vary - Bezručova	11.7.2007	Matějů Jan	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>54</b>	Blatno (Ústí nad Labem)	3.10.2007	Matějů Jan	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>56</b>	Javorník (Liberec)	2007	Zahradiček Oldřich	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>64</b>	Litoměřice	2007	Falco Dolní Týnec	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>102</b>	Praha-Suchdol	19.6.2008	Šandera Martin	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>106</b>	Valdice	12.8.2008	Šandera Martin	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>107</b>	Bystřice	12.8.2008	Šandera Martin	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>114</b>	Praha-Trója	5.7.2008	Pihartová Tereza	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>115</b>	Praha-Trója	23.5.2008	Pihartová Tereza	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>125</b>	Česká Lípa	28.8.2007	Falco Dolní Týnec	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>128</b>	Most	2008	Dvorská Zdena	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>180</b>	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>184</b>	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>185</b>	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>191</b>	Přestice	9.2.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>197</b>	Spálené Poříčí	26.11.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>199</b>	Kolínec	21.11.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger440</b>	Badensko-Wuerttembersko-Karlsruhe		Petney Trevor	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>ger441</b>	Badensko-Wuerttembersko-Stocksberg		Petney Trevor	<b>EE15</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	<b>81</b>	Praha západ	7.4.2008	Dvorská Zdena	<b>EE15</b>	
<i>E. europaeus</i>	<b>177</b>	Ústí nad Orlicí	24.10.2008	ZS Pavlov	<b>EE15</b>	

<i>E. europaeus</i>	186	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	EE15	
<i>E. europaeus</i>	198	Kolínec	20.11.2008	ekocentrum Spálené Poříčí	EE15	
<i>E. europaeus</i>	104	Pláček u Humpolce	31.7.2008	ZS Pavlov	EE16	ano
<i>E. europaeus</i>	ger437	Bavorsko - Mnichov	2008	Petney Trevor	EE17	ano
<i>E. europaeus</i>	sci	Sicilie, San Vito lo Capo, Timpone	5.7.2007	Bolífková Barbora, Hulva Pavel, Zahradníček Oldřich	EE18	ano
<i>E. europaeus</i>	prt	Portugalsko, Geres	28.9.2007	Gvoždík Václav	EE19	ano
<i>E. europaeus</i>	fr	Francie, Orange	17.7.2008	Šmíd Jiří	EE20	
<i>E. roumanicus</i>	1	Praha-Krč	26.4.2007	Bolífková Barbora, Hulva Pavel, Kaftan Milán	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	8	Předonín U Štětí	6.5.2007	Lučan Radek	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	9	Předonín U Štětí	6.5.2007	Lučan Radek	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	10	Zlönice U Slaného	6.5.2007	Lučan Radek	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	14	Lednice	30.5.2007	Bolífková Barbora, Hulva Pavel	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	16	Praha-Kajetánka	2.6.2007	Bolífková Barbora	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	17	Praha-Stromovka	1.6.2007	Gvoždík Václav	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	21	Praha-Kajetánka	7.6.2007	Bolífková Barbora, Hulva Pavel	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	22	Praha-Kajetánka	7.6.2007	Bolífková Barbora, Hulva Pavel	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	24	Praha-Jižní Město	7.7.2007	Bolífková Barbora, Schneiderová Irena	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	25	Praha-Jižní Město	7.7.2007	Bolífková Barbora, Schneiderová Irena	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	26	Praha-Jižní Město	7.7.2007	Bolífková Barbora, Schneiderová Irena	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	27	Praha-Jižní Město	7.7.2007	Bolífková Barbora, Schneiderová Irena	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	28	Praha-Jižní Město	7.7.2007	Bolífková Barbora, Schneiderová Irena	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	29	Praha-Jižní Město	7.7.2007	Bolífková Barbora, Schneiderová Irena	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	32	Velké Karlovice	17.6.2007	Šobotník Jan	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	47	Praha-Trója	2.9.2007	Bolífková Barbora	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	58	Praha-Prosek	17.11.2007	Gvoždík Václav	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	59	Praha-Prosek	17.10.2007	Gvoždík Václav	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	84	Praha 9	7.4.2008	Dvorská Zdena	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	85	Praha 4	7.4.2008	Dvorská Zdena	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	101	Čelákovice	17.5.2008	Hulva Pavel	ER01	ano
<i>E. roumanicus</i>	112	Praha-Staré Bohnice	31.5.2008	Pithartová Tereza	ER01	ano

<i>E. roumanicus</i>	113	Praha-Bohnice	25.6.2008	Pithartová Tereza	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	116	Praha-Trója	18.6.2008	Pithartová Tereza	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	117	Praha-Trója	10.7.2008	Pithartová Tereza	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	121	Čelákovice	31.5.2008	Pithartová Tereza	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	123	Praha-Viničná	18.5.2008	Kaftan Milán	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	124	Praha-Viničná	19.5.2008	Kaftan Milán	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	129	Litoměřice	2008	Dvorská Zdena	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	135	Olomouc	2008	Zoo Olomouc	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	144	Praha-Prosek	5.6.2008	Gvoždík Václav	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	147	Velké Meziříčí	1.8.2008	ZS Pavlov	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	149	Světlá nad Sázavou	1.10.2008	ZS Pavlov	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	164	Litoměřice	9.6.2008	Falco Dolní Týnec	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	168	Litoměřice	9.6.2008	Falco Dolní Týnec	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	183	Chomutov	2008	Zoo Chomutov	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	209	Rychvald	19.4.2009	Bořiková Barbora, Hulva Pavel, Janko Karel	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	214	Vratimov	10.10.2008	ZS Bartošovice	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	pl	Polsko, Varšava	2009	Bartonička Tomáš	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	sk12	Slovensko, Bratislava	2009	Varadinová Zuzana	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	sk14	Slovensko, Bánská Bystrica	2009	Mikuliček Petr	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	sk15	Slovensko, Senica	2009	Mikuliček Petr	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	sk16	Slovensko, Bratislava - Bohrova	2009	Mikuliček Petr	<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	sk17	Slovensko, Dojč	2009		<b>ER01</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	139	Staré město (Uherské Hradiště)	2008	Baláž Vojto	<b>ER02</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	5	Libenice	26.4.2007	Bořiková Barbora, Hulva Pavel, Kaftan Milán	<b>ER03</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	96	Znojmo	2.5.2008	Reiter Antonín	<b>ER04</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	blg	Bulharsko, Avsenovgrad, Bezovo	21.9.2008	Gvoždík Václav	<b>ER05</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	sk13	Slovensko, Brusno	2009	Mikuliček Petr	<b>ER06</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	sk8	Slovensko, Poltár	2009	Ferenc Michal	<b>ER06</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	sk9	Slovensko, Radovce	2009	Ferenc Michal	<b>ER06</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	43	Horní Počrnice	17.7.2007	Gvoždík Václav	<b>ER07</b>	ano
<i>E. roumanicus</i>	98	Vitonice	6.6.2008	Reiter Antonín	<b>ER07</b>	ano

<i>E. roumanicus</i>	sk7	Slovensko, Cinobaňa	2009	Ferenc Michal	<b>ER07</b>	ano
<i>E. europaeus</i>	6	Mořina	28.4.2007	Hulva Pavel, Holý Ivo		ano
<i>E. europaeus</i>	12	Příbram	6.5.2007	Lučan Radek		ano
<i>E. europaeus</i>	13	Frametz (CHKO Třeboňsko)	12.5.2007	Lučan Radek		ano
<i>E. europaeus</i>	23	Praha-Jižní Město	6.7.2007	Schneiderová Irena		ano
<i>E. europaeus</i>	49	Karlovy Vary - Drahovice	20.6.2007	Matějů Jan		ano
<i>E. europaeus</i>	50	Aš	10.7.2007	Matějů Jan		ano
<i>E. europaeus</i>	55	Blíže Karpaty	2007	Šobotník Jan		ano
<i>E. europaeus</i>	57	Pardubice	2007	ZS Pasička		ano
<i>E. europaeus</i>	89	Vlašim	23.10.2007	ekocentrum Vlašim		ano
<i>E. europaeus</i>	118	Praha-Trója	28.5.2008	Pihartová Tereza		ano
<i>E. europaeus</i>	119	Praha-Trója	5.6.2008	Pihartová Tereza		ano
<i>E. europaeus</i>	133	Gočův Jeníkov	2008	Šmíd Jiří		ano
<i>E. europaeus</i>	189	Chomutov	19.11.2007	Zoo Chomutov		ano
<i>E. europaeus</i>	193	Dobruška	6.6.2008	ekocentrum Spálené Poříčí		ano
<i>E. europaeus</i>	201	Kolinec	23.11.2008	ekocentrum Spálené Poříčí		ano
<i>E. europaeus</i>	202	Kolinec	24.11.2008	ekocentrum Spálené Poříčí		ano
<i>E. europaeus</i>	ger434	Bavorsko - Mnichov	2008	Petney Trevor		ano
<i>E. europaeus</i>	ger442	Hamburk	2008	Petney Trevor		ano
<i>E. europaeus</i>	ger443	Hamburk	2008	Petney Trevor		ano
<i>E. europaeus</i>	ger451	Badensko-Wuerttembersko-Karlsruhe	2008	Petney Trevor		ano
<i>E. roumanicus</i>	7	Praha-Břevnov	29.4.2007	Bořilová Barbora, Hulva Pavel		ano
<i>E. roumanicus</i>	18	Liběchov	22.5.2007	Gvoždík Václav		ano
<i>E. roumanicus</i>	44	Horní Počernice	30.8.2007	Gvoždík Václav		ano
<i>E. roumanicus</i>	111	Praha-Bohnice	2.6.2208	Pihartová Tereza		ano
<i>E. roumanicus</i>	126	Roudnice nad Labem	16.9.2007	Falco Dolní Týnec		ano
<i>E. roumanicus</i>	142	Praha-Čimice	2008	Baláž Vojto		ano
<i>E. roumanicus</i>	rmn2	Rumunsko - Silón	2008	Černý Jiří		ano
<i>E. roumanicus</i>	rmn3	Rumunsko - Silón	2008	Černý Jiří		ano
<i>E. roumanicus</i>	sk10	Slovensko, Radovce	2008	Ferenc Michal		ano
<i>E. roumanicus</i>	sk11	Slovensko, Radovce	2008	Ferenc Michal		ano
<i>E. concolor</i>	trc2	Turecko - Hatay, Karacay	11.4.2008	Baláž Vojto		ano



## 2.1. Izolace DNA

Genomická DNA byla vyizolována kitem DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce. V posledním kroku byla DNA z membrány vymyta 100 µl pufru AE. Takto získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20°C.

## 2.2. Kontrolní oblast mtDNA

### 2.2.1. PCR

Vzhledem ke geografickému a fylogenetickému rozsahu studie byl vybrán úsek mitochondriální DNA s nejvyšší mutační rychlostí - kontrolní oblast. Pro amplifikaci 5' části této sekvence, obsahující její levou hypervariabilní doménu, byla použita kombinace primeru ProL-He (5'-ATACTCCTACCATCAACACCCAAAG-3'), umístěného v oblasti genu tRNA<sup>Pro</sup> a DLH-He (5'-TCCTGAAGAAAGAACCAGATGTC-3'), umístěného v oblasti konzervativního sekvenčního bloku E (Seddon et al. 2001). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 1 a program PCR reakce v tabulce 2. Vlastní PCR reakce probíhaly v termocyklerech PTC-200 (MJ Research) a iCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BIO-RAD). Zpočátku byla efektivita PCR ověřována pomocí gelové elektroforézy (1% agarový gel v TBE pufru).

C <sub>final</sub>		V <sub>final</sub> (µl)
H <sub>2</sub> O		10,3
buff	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5
dNTP	0,2 mM	2,5
prim1	0,5 µM	1,25
prim2	0,5 µM	1,25
Taq	1 u/µl	0,2
DNA	100 ng/µl	2
Celkem		25

**Tab. 1.** Koncentrace a složení reakční směsi pro PCR kontrolní oblasti.

cyklus	krok	T <sub>an</sub> (°C)	t (min)
1(1x)	1	94	3
2(30x)	1	94	1
	2	56	1
	3	72	1
3(1x)	1	72	1
4(1x)	1	4	for ever

**Tab. 2.** Program termocyklieru pro PCR kontrolní oblasti.

### 2.2.2. Přechištění

PCR produkt byl přechištěn kitem Qiaquick PCR purification kit (Qiagen), postup se řídil protokolem od výrobce. V posledním kroku byl namnožený úsek mtDNA z membrány kolonky vymyt 30 µl pufru AE. Čistý produkt byl skladován při teplotě -20°C. Koncentrace čistého PCR produktu byla změřena na Spektrofotometru ND-1000 (Nanodrop®) v sekvenační laboratoři biologické sekce PřF UK.

### 2.2.3. Sekvenování

Sekvenační analýza byla provedena jednosměrně s primerem DLH-He. Sekvenační reakce byly provedeny v servisních laboratořích Macrogen v Korei (kde bylo zasláno 20 µl PCR produktu o koncentraci 50 ng/µl a 2 µl primeru o koncentraci 5 µM na jeden vzorek) a v laboratoři sekvenace DNA na PřF UK na přístroji 3100 Avant Genetic Analyzer (kde bylo dodáno 3,2 µl primeru o koncentraci 1 µM, 10 ng PCR produktu a H<sub>2</sub>O na doplnění do objemu 14 µl). Sekvenační data jsou uvedena v příloze.

## 2.3. Mikrosatelity

### 2.3.1. PCR

Použili jsme 11 mikrosatelitových lokusů, které byly vyvinuty ve Velké Británii pro populační studii u *E. europaeus* (Becher & Griffiths 1997, Henderson et al. 2000). Přehled primerů, jejich annealing teplot a fluorescenčního značení je uveden v tabulce 3. Primery byly otestovány pro *E. roumanicus* a *E. concolor*. Efektivita amplifikace byla ověřena gelovou elektroforézou (1% a 2% agarový gel v TBE pufru)

Pro všechny lokusy byly nasyntetizovány fluorescenčně značené forward primery. Ty byly zkombinovány do tří sad podle annealing teploty.

Sada 1 – EEU5, EEU6, EEU43H, EEU54H ( $T_{an}=56^{\circ}\text{C}$ )

Sada 2 – EEU1, EEU2, EEU3, EEU4 ( $T_{an}=62^{\circ}\text{C}$ )

Sada 3 – EEU12H, EEU36H, EEU37H ( $T_{an}=64^{\circ}\text{C}$ )

lokus	přístupové číslo GeneBank	Sekvence primeru (5' — > 3')	Jednotka opakování	fluorescenční značení
EEU1	U63910	F: CTGCATGTACCTCTCCTCTACCTC R: TTTTCTTTTTCCACCGGTGTTATC	d(CA) <sub>15</sub>	VIC
EEU2	U63911	F: GTAGGGACCGAGGGCTTGAAGTG R: GACTGGCATTACCCCTAAAACACAT	d(CA) <sub>18</sub>	PET
EEU3	U63912	F: TCAACAGAAGACAGGAGCAGATACAGG R: GAACTTCCACCAGAACATCAAGGCT	d(CA) <sub>18</sub>	FAM
EEU4	U63913	F: GTGGTTAGAGCAGCAAGGACT R: AGCTCTTAGCACTGGGTCTGA	d(CA) <sub>19</sub>	NED
EEU5	U63914	F: TGCATGAGGAACCAAATTCAA R: CAGCATGGATGTCCCACTACT	d(CA) <sub>24</sub>	VIC
EEU6	U63915	F: CAGTGAAGTTAAGGGTGGCTTT R: TATGCTGGGTGGGTCTCTTCT	d(GA) <sub>18</sub>	PET
EEU12H	AF276820	F: CTGCATGTACCTCTCCTCTACCTC R: TTTTCTTTTTCCACCGGTGTTATC	d(CT) <sub>15</sub>	FAM
EEU36H	AF276822	F: GACTCTGGAACCTCAAACCAGG R: GGTAGACAGAGAGATCAAAAGGGA	d(CT) <sub>21</sub>	NED
EEU37H	AF276823	F: ATGAGGTGAGGCTTACCAAAAA R: GGAATCTCACAGATGTAAAGTTCTAGC	d(GT) <sub>23</sub>	VIC
EEU43H	AF276824	F: CCATGTACAGTGGATTTACCTGC R: ACCCTAGGAGCAACTTGGAGAT	d(GT) <sub>25</sub> (GA) <sub>6</sub>	FAM
EEU54H	AF276825	F: CATCGGCTCAGCATTCTCTT R: ATCCCCAGAGTTGTGTTTGC	d(GA) <sub>31</sub>	NED

**Tab. 3.** Přehled mikrosatelitových primerů, jejich přístupových čísel do GeneBank, jednotek opakování a fluorescenčního značení.

Pro reakci byl použit kit Multiplex PCR (Qiagen). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 4. Primer mix obsahoval 5  $\mu\text{l}$  ( $c=100 \mu\text{M}$ ) fluorescenčně značeného forward primeru, 5  $\mu\text{l}$  ( $c=100 \mu\text{M}$ ) neznačeného reverse primeru a objem byl doplněn na 250  $\mu\text{l}$  pufrem TE. Program PCR reakcí je uveden v tabulce 5.

	$c_{\text{final}}$	$V_{\text{final}} (\mu\text{l})$
PCR master mix	1x	5
primer mix	0,2 $\mu\text{M}$	1
Rnase-free water		3
DNA	4ng/ $\mu\text{l}$	1
celkem		10

**Tab. 4.** Koncentrace a složení reakční směsi pro PCR mikrosatelitů.

cyklus	skupina	T (°C)	t (min)
1(1x)	1	95	15
2(28x)	1	94	0,5
	2	56 or 62 or 64	1,5
	3	72	1
3(1x)	1	60	30
4(1x)	1	4	for ever

**Tab. 5.** Program termocyklieru pro PCR mikrosatelitových lokusů.

### 2.3.2. Fragmentační analýza

Směs pro fragmentační analýzu obsahovala 2 µl PCR produktu, 7,5 µl formamidu a 0,5 µl velikostního standardu (Gene Scan<sup>TM</sup> 500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems). Tato směs byla 5 min denaturována při teplotě 95°C a poté zchlazena na 4°C nebo skladována při teplotě -20°C. Fragmentační analýza byla provedena v sekvenačním centru PřF UK na sekvenátoru ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) s polymerem POP4 a standardem DS-33.

## 2.4. Analýza dat

### 2.4.1. Sekvence

Celkem bylo získáno 216 sekvencí. Osekvenované úseky mitochondriálního genomu byly editovány v programu SeqMan 5.05 (Swindell & Plasterer 1996) a všechny sekvence byly zkráceny na stejnou délku - 410 bazí. Upravené sekvence byly vyexportovány a alignovány v programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999) pomocí ClustalW (Thompson et al. 1994).

Model evoluce sekvencí byl odhadnut v programu Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998) za použití Akaikova kritéria.

Základní fylogenetická hypotéza byla vytvořena metodou Neighbour-Joining s použitím p-distancí (Saitou & Nei 1987) v programu MEGA 4 (Tamura et al. 2007). Statistická podpora větví byla testována metodou bootstrap (1000 replikací). Jednotlivé haplotypy byly označeny kódem druhu a číslem. Protože se práce zabývá hlavně vnitrodruhovou variabilitou a pracuje s malými genetickými vzdálenostmi, nejsou topologie stromů hlavním zdrojem informací, sofistikovanější metody tvorby stromů (maximum likelihood, Bayesiánská analýza) proto nebyly použity a důraz byl kladen na metody vhodnější pro analýzy genealogií.

Pro vizualizaci vztahů mezi haplotypy byla v programu Network 4.5.1.2 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) metodou Median-Joining (Bandelt et al 1999) vytvořena haplotypová síť, která umožňuje identifikovat ancestrální a odvozené haplotypy. Z této analýzy byli vyřazeni jedinci 151-154, jednalo se o sourozence a jako zástupce byl ponechán jedinec číslo 150.

Demografické procesy, které proběhly v minulosti ve zkoumané populaci, mohou být rekonstruovány pomocí různých přístupů. Základní představu je možné získat pomocí sumárních statistik popisujících genetickou variabilitu v datech. Například vysoké hodnoty haplotypové ( $h$ ) i nukleotidové ( $\pi$ ) diverzity ukazují na dlouhodobě velkou populaci, zatímco vysoké hodnoty haplotypové diverzity a nízké hodnoty nukleotidové diverzity spíše odpovídají recentní expanzi.

Odhad změn populační velikosti v minulosti byl proveden metodou mismatch distribution (Schneider & Excoffier 1999), která porovnává pozorované frekvence párových distancí s těmi očekávanými podle demografického modelu. U modelu exponenciálního růstu populace je očekávána jednovrcholová (unimodal) distribuce. Naopak vícevrcholová (multimodal) distribuce je očekávána u populace, která se blíží k rovnováze mezi driftem a mutacemi. Pro porovnání času expanze byl vypočten parametr  $\tau$  ( $\tau$ ), měřený v mutačních jednotkách.  $\tau = 2ut$ , kde  $t$  je čas v generacích a  $u = \mu k$ , kde  $\mu$  je mutační rychlost a  $k$  je délka sekvence. Vyšší  $\tau$  značí delší čas od expanze. Dále jsme použili raggedness statistiku, která počítá odchylky okolo křivky mismatch distribution. Pokud je tato analýza nesignifikantní, znamená to, že v datech není podpora pro stabilní populační velikost.

Sumární statistiky založené na párových srovnáních nevyužívají všechnu informaci o demografické minulosti obsaženou v datech (např. Felsenstein 1992). Účinnými nástroji při detekci signálu populačního růstu se ukázaly být testy neutrality (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Srovnáním testů neutrality lze navíc odlišit mezi populační expanzí a genetickým svezením se (hitchhiking), které zanechávají podobný signál v datech (Fu 1997). Záporné hodnoty Tajimova  $D$  a Fuova  $F_s$  značí převahu segregujících míst v alelách s nízkou frekvencí, což ukazuje na populační expanzi a/nebo negativní selekci. Kladné hodnoty naopak znamenají nízkou hladinu polymorfismů s vysokou i nízkou frekvencí a to ukazuje na pokles populační velikosti a/nebo balancující selekci, např. v populaci po bottlenecku. Dále jsme použili raggedness statistiku, která počítá odchylky okolo křivky mismatch distribution. Pokud je tato analýza nesignifikantní, znamená to, že v datech není podpora pro stabilní populační velikost.

Tyto parametry: počet haplotypů, počet variabilních míst, haplotypová diverzita, nukleotidová diverzita, testy neutrality a mismatch distribution byly vypočteny v programu DnaSp V5 (Rozas et al. 2005) a v programu Arlequin Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005).

Nejnovější přístupy k popisu populační dynamiky v minulosti jsou založeny na koalescenční teorii a zohledňují stochasticitu procesů, které vedly ke vzniku popisovaných genealogií. Zde jsme použili Bayesiánské skyline ploty (Drummond et al. 2005). Metoda skyline plotů (Pybus et al. 2000) a generalizovaných skyline plotů (Strimmer & Pybus 2001) je na rozdíl od starších koalescenčních přístupů nezávislá na *a priori* definovaném "demografickém modelu" (matematické funkci popisující změnu efektivní velikosti populace v čase pomocí "demografických parametrů") a odhaduje populační velikost na základě odhadu genealogické struktury. Bayesiánské skyline ploty používají proceduru Markov chain Monte Carlo (MCMC) k odhadu posteriorní distribuce efektivní velikosti populace za použití daného substitučního modelu přímo ze sekvenčních dat. Tímto přístupem se zbavují závislosti na fylogenetické rekonstrukci (a proto se do nich nepromítá chyba spojená s touto rekonstrukcí, která se vyskytuje hlavně u méně variabilních datasetů). Tato metoda také v každém bodě poskytuje konfidenční interval pro odhad efektivní velikosti populace (spojený se stochasticitou popisovaných koalescenčních jevů) a poskytuje díky MCMC algoritmu hladší průběh než u klasických skyline plotů. Senzitivita Bayesiánských skyline plotů navíc umožňuje odhalit demografické trendy detailněji než dokáží jednoduché parametrické modely.

Analýza byla provedena v programu BEAST 1.4.8. (Drummond & Rambaut 2007) s 30 000 000 iterací, genealogie a parametry modelu byly vzorkovány každých 1000 iterací.

#### **2.4.2. Mikrosatelity**

Délka jednotlivých alel byla odečtena v programu GeneMarker V1.85 ([www.softgenetics.com](http://www.softgenetics.com)) po přihlédnutí k případnému výskytu artefaktů *in vitro* amplifikace (stutter bands, +A alely). Celkem bylo zgenotypováno 225 jedinců (délky alel v příloze). Z analýz byly vyřazeny lokusy EEU1 z důvodu špatné amplifikace a EEU36H kvůli fixované délce lokusu ve střední Evropě.

Pro základní zviditelnění vztahů mezi jedinci na základě mikrosatelitových dat byla provedena faktoriální korespondenční analýza programem Genetix 4.0.5.2 (Belkhir et al. 2004). Do analýzy vstupovali pouze jedinci se známou sekvencí kontrolního úseku mtDNA i

mikrosatelitových alel. Jedinci byli rozděleni do skupin podle druhu. Celkem bylo do analýzy zahrnuto 226 jedinců, a to 65 *E. roumanicus*, 158 *E. europaeus* a 3 *E. concolor*.

Chyby při genotypování z důvodu výskytu artefaktů *in vitro* amplifikace a přítomnost nulových alel byla testována v programu MICRO-CHECKER za použití Monte Carlo simulací očekávaných rozdílů velikostí alel (Van Oosterhout et al. 2004). Lokusy s vysokou frekvencí nulových alel vykazují zdánlivě vysoký počet homozygotů (Goodman et al. 1999). Dále byla vypočtena distribuce frekvencí alel v každém lokusu, byla zjištěna přítomnost druhově specifických alel pro každý druh, odhadnuta frekvence nulových alel, zjištěna vazebná rovnováha a spočítána hodnota  $F_{st}$  (fixační index) a  $F_{is}$  (koeficient inbreedingu v programu GenePop V4 (Rousset 2008)).  $F_{st}$  měří snížení heterozygotity subpopulací v poměru k celkové populaci, v důsledku genetického driftu u subpopulací. Hodnoty se pohybují od 0 (žádná diferenciace) do 1 (úplná diferenciace). Jedná se o míru diferenciace mezi subpopulacemi.  $F_{is}$  měří snížení heterozygotity v důsledku nenáhodného páření uvnitř populace, jeho hodnoty jsou od -1 (žádní homozygoti) do +1 (žádní heterozygoti). Jde o míru inbreedingu uvnitř subpopulace.

Byl zjištěn počet alel, odhadnuta očekávaná ( $H_e$ ) a pozorovaná ( $H_o$ ) heterozygotnost a testovány odchylky u každého lokusu od Hardy-Weinbergovy rovnováhy v programu Arlequin Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005). Hladina signifikance Hardy-Weinbergovy rovnováhy byla testována 100000 kroky MCMC (Markov Chain Monte Carlo).

Do všech analýz vstupovala data jedinců z České republiky a Slovenska, určených do druhu analýzou mtDNA a analýzou v programu NewHybrids (viz níže).

Pro zjištění patternu v jaderných datech, přiřazení individuí do populací a pro identifikaci případných hybridů byla použita metoda Bayesiánského klastrování s modelem korelovaných frekvencí alel (Falush et al. 2003) v programu STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000). Počet opakování MCMC byl 1 000 000 kroků po 100 000 kroků dlouhé burn-in periodě. Byla použita informace o druhovém zařazení každého jedince na základě mtDNA a výsledků z programu NewHybrids, počet  $K$  (počet klastrů) byl *a priori* zadán jako 2. Program určil pravděpodobnost, s jakou každý jedinec patří do příslušného klastru, hodnotu  $q$ , což je odhad membership koeficientu u každého jedince v příslušném klastru a hodnotu  $\alpha$ , která popisuje míru konvergence Markov Chain.

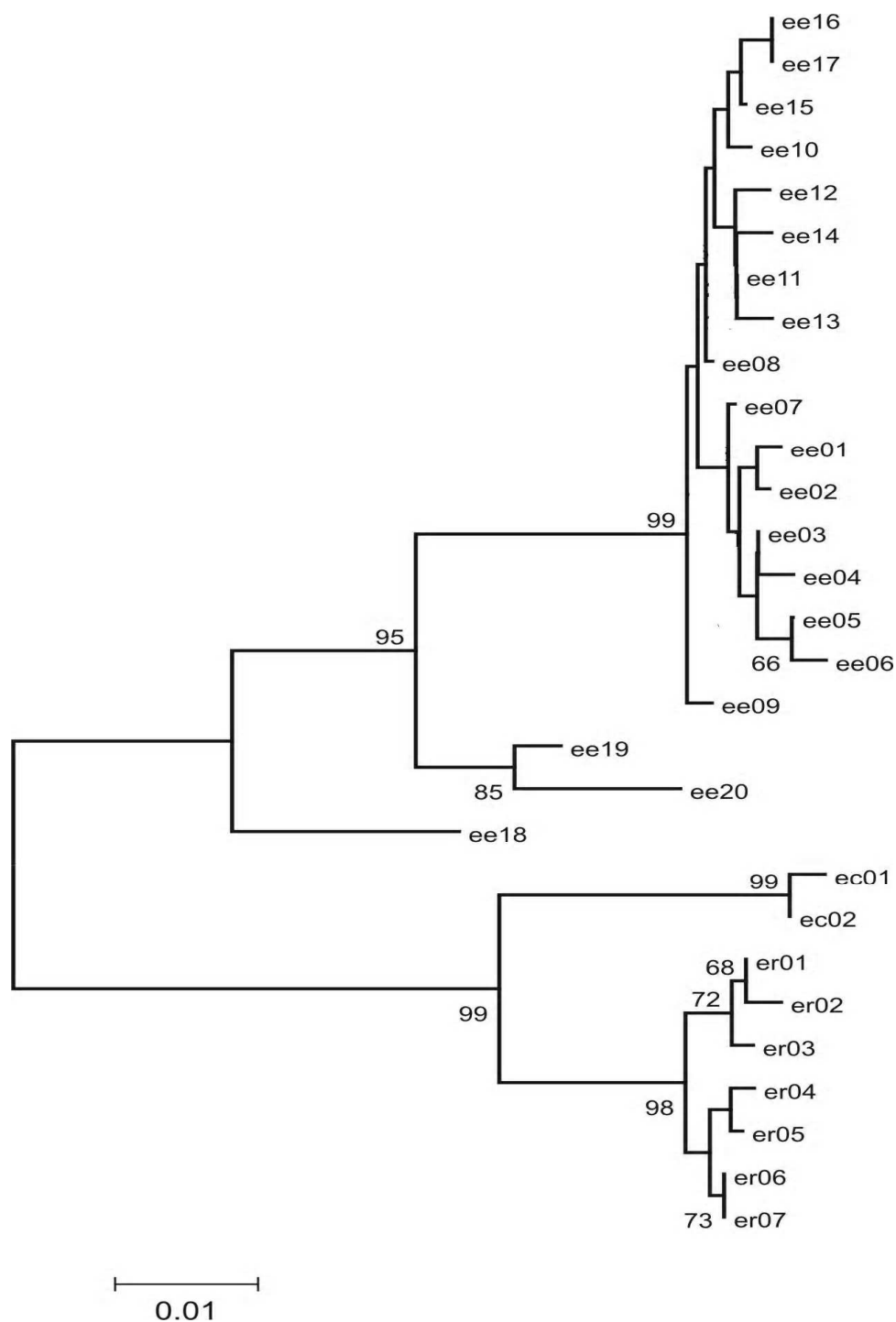
Případný výskyt recentní hybridizace a introgrese byl zjišťován pomocí programu NewHybrids 1.1 (Anderson & Thompson, 2002). Program používá Bayesiánské klastrování

založené na modelu k zjištění posteriorní pravděpodobnosti příslušnosti individuů do předem definovaných hybridních kategorií. Vzhledem k charakteru dat byla testována příslušnost ke skupinám, které se mohou vyskytnout při křížení mezi dvěma druhy během dvou generací (čistý *E. europaeus*, čistý *E. roumanicus*, F1, F2, zpětný kříženec F1 s *E. europaeus*, zpětný kříženec F1 s *E. roumanicus*). Podle doporučení autorů programu byla MCMC analýza provedena s burn-in periodou 10 000 kroků a s vlastní analýzou 100 000 kroků. Konvergence řetězců byla testována vizuálně při několika nezávislých bězích programu.



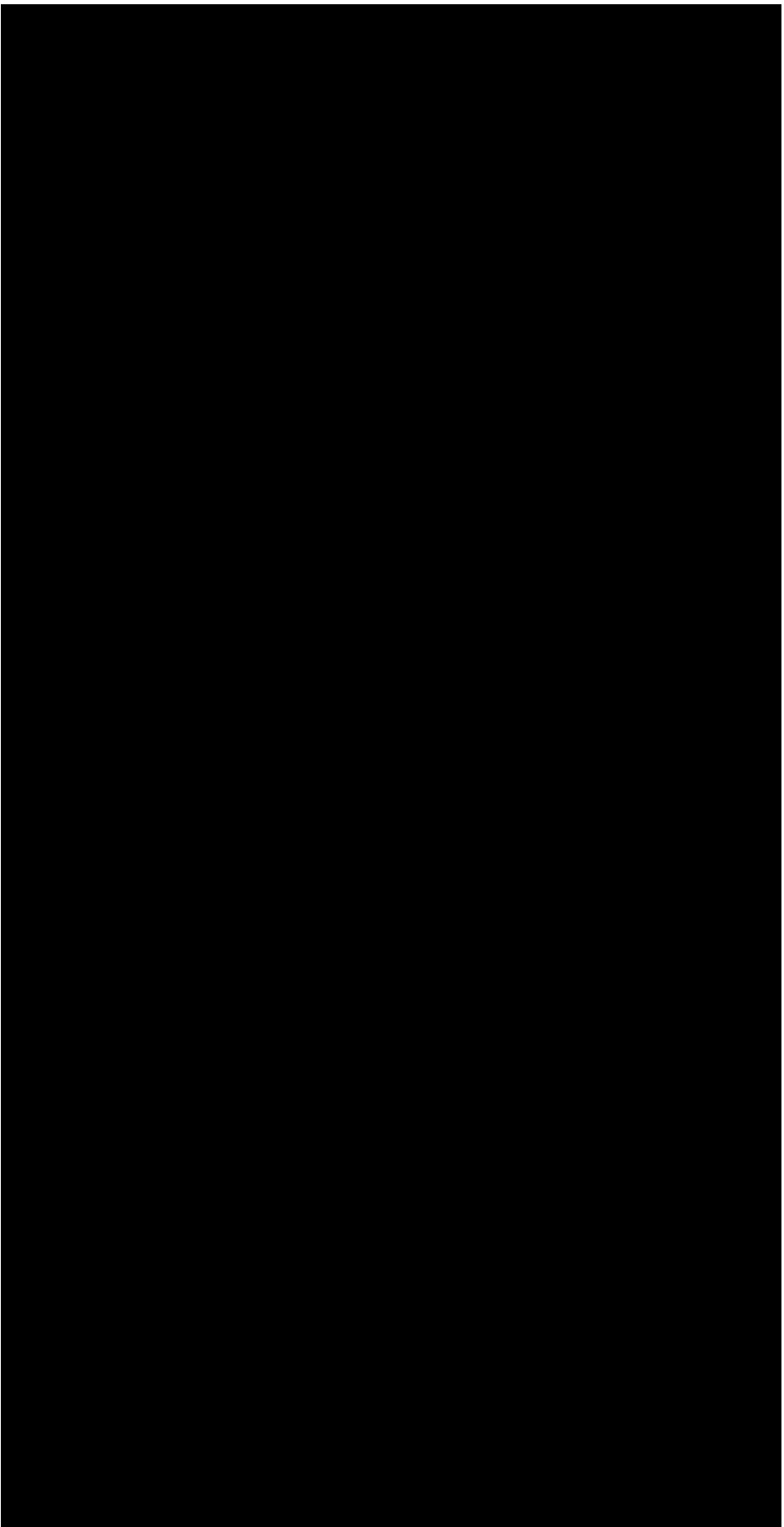


Byly identifikovány haplotypy a byl spočten strom znázorňující vztahy mezi nimi. (obr 9)



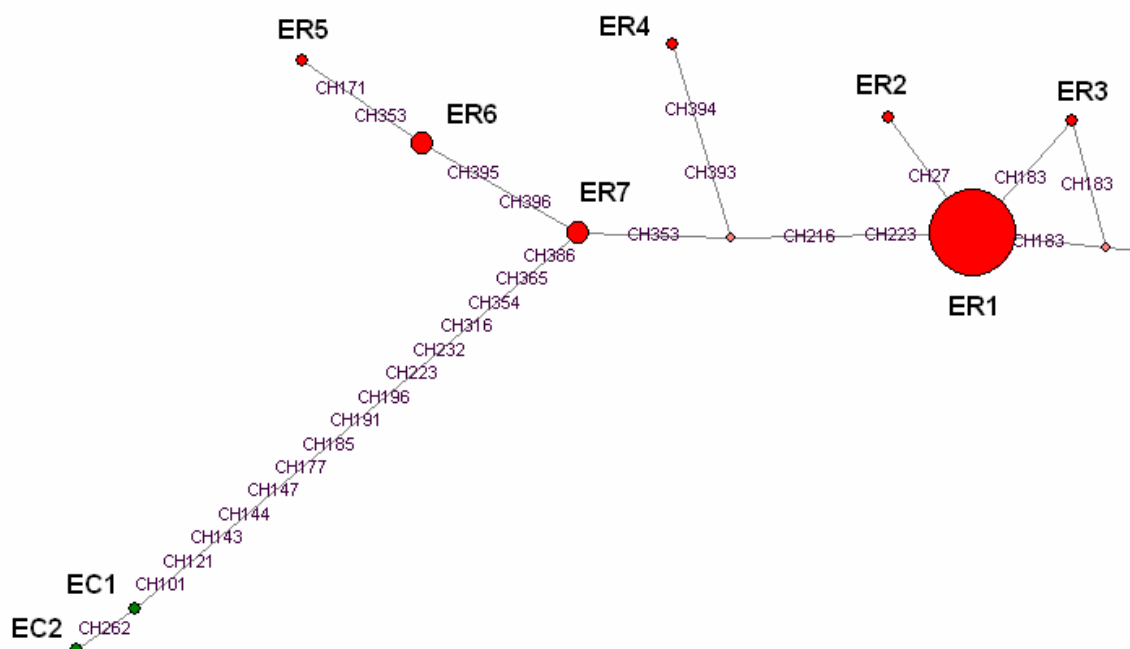
**Obr. 9.** Fylogenetický strom vytvořený metodou NJ, haplotypy jsou označeny kódem druhu (ee = *E. europaeus*, ec = *E. concolor*, er = *E. roumanicus*) a číslem, znázorněny jsou hodnoty bootstrapu nad 50.

Vzdálenosti mezi haplotypy jsou ilustrovány pomocí p-distancí (tab. 6).



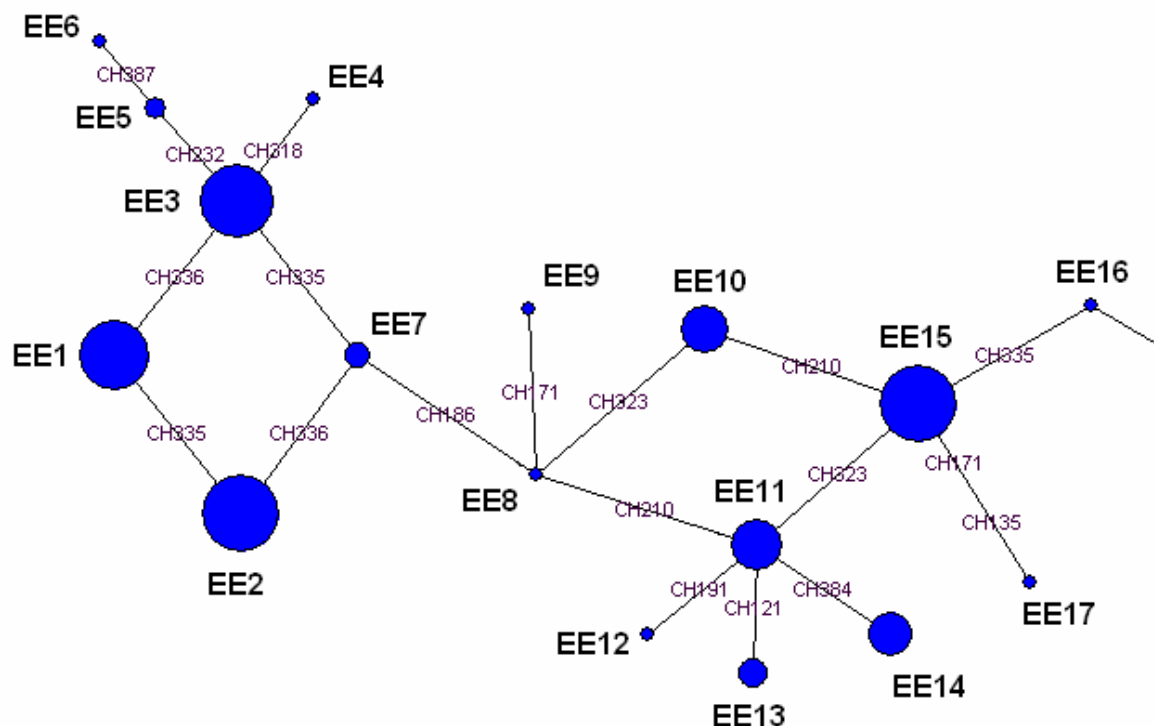
**Tab. 6.** Vzdálenosti mezi haplotypy ilustrované pomocí nekorigovaných p-distancí.

Celkově bylo rozpoznáno 29 haplotypů, z toho 20 u *E. europaeus*, 7 u *E. roumanicus* a 2 u *E. concolor*. Pro vizualizaci vztahů mezi haplotypy byla vytvořená haplotypová síť metodou Median-Joining (obr. 10; 11)



**Obr. 10.** Haplotypová síť pro *E. roumanicus* a *E. concolor* vytvořená metodou Median-Joining. Haplotypy jsou znázorněny barevnými kruhy a jejich velikost odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Červeně jsou označeni *E. roumanicus* (ER1-ER7), zeleně *E. concolor* (EC1-EC2) a růžové jsou hypotetické haplotypy v místech divergencí linií. Čísla na spojnicích mezi haplotypy označují místa mutací.

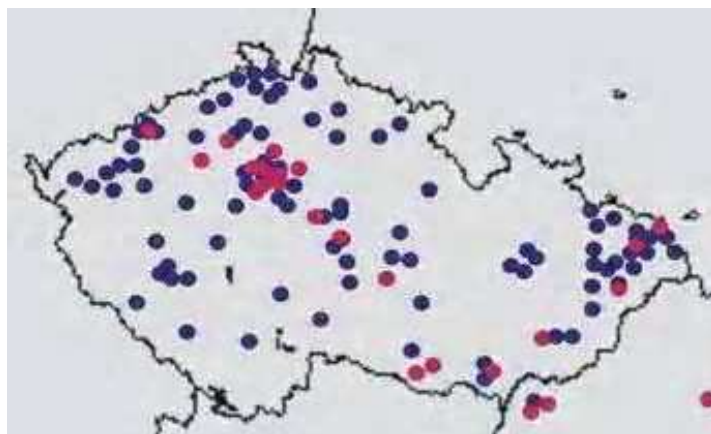
U *E. roumanicus* převládá haplotyp ER1, který byl nalezen u 45 jedinců z 55, ostatní haplotypy mají pouze malé zastoupení a od ER1 se liší několika mutačními kroky. V datech se objevuje náznak star-like phylogeny, která odpovídá recentní expanzi. Nejmenší genetická vzdálenost *E. roumanicus* od *E. concolor* je 15 mutačních kroků a od *E. europaeus* 27 mutačních kroků.



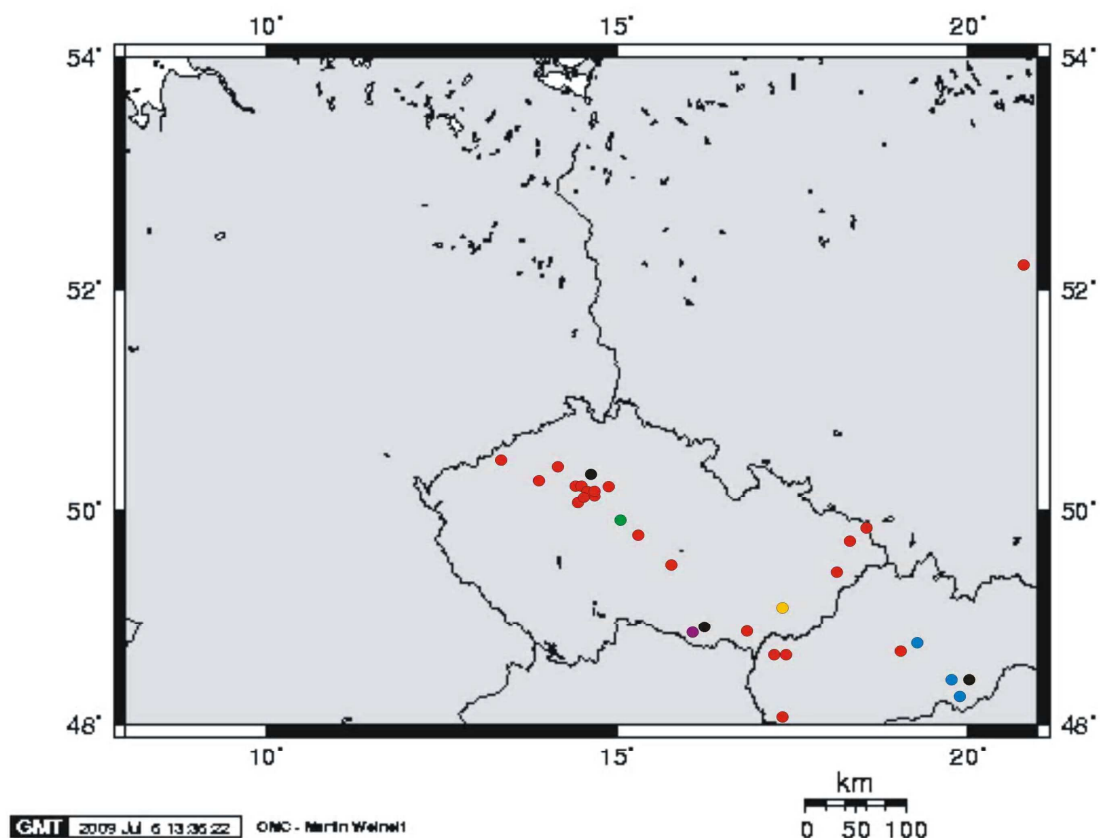
**Obr. 11.** Haplotypová síť pro *E. europaeus* vytvořená metodou Median-Joining. Haplotypy jsou znázorněny barevnými kruhy (EE1-EE17) a jejich velikost je proporční k počtu jedinců s daným haplotypem. Čísla na spojnicích mezi haplotypy označují místa mutací.

U *E. europaeus* je haplotypová síť komplexnější. Nejdistantnější haplotyp pocházel ze Sicílie (17 mutačních kroků od Francie i Portugalska a 28 od střední Evropy). Největší zastoupení měly haplotypy EE2 (28 jedinců), EE15 (27 jedinců), EE3 (26 jedinců) a EE1 (21 jedinců). Většinou se od sebe haplotypy lišily jednou mutací (pouze haplotyp EE17 z Mnichova dvěma mutacemi).

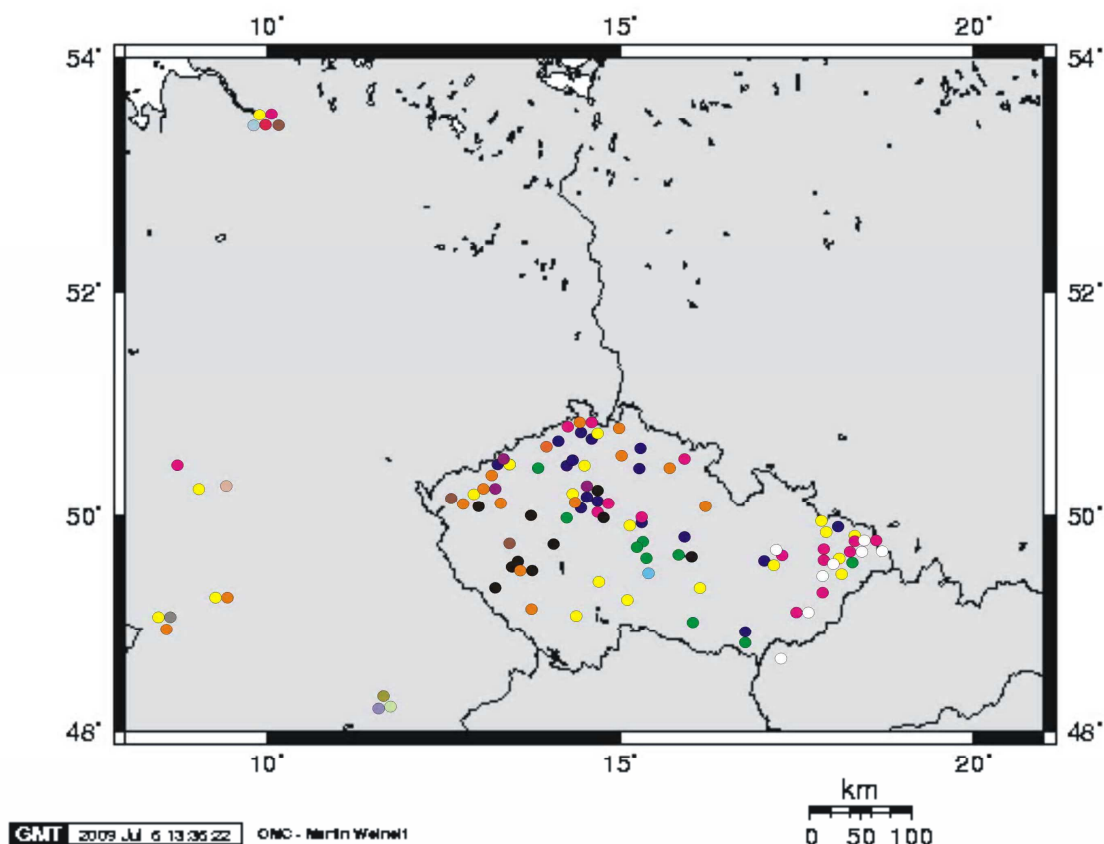
Pro zobrazení geografické variability a rozšíření haplotypů byly vytvořeny haplotypové mapy pro oba druhy ve střední Evropě (obr. 12; 13; 14).



**Obr. 12.** Výskyt druhu *E. europaeus* (modře) a *E. roumanicus* (červeně) v České republice. Jedinci byli určeni do druhu podle sekvence části kontrolní oblasti mtDNA.



**Obr. 13.** Haplotypová mapa části kontrolního úseku mtDNA pro *E. roumanicus* ve střední Evropě. Haplotypy: ER1 červená, ER2 žlutá, ER3 zelená, ER4 fialová, ER6 modrá a ER7 černá.



**Obr. 14.** Haplotypová mapa části kontrolního úseku mtDNA pro *E. europaeus* ve střední Evropě. Haplotypy: EE1 tmavě modrá, EE2 žlutá, EE3 růžová, EE7 hnědá, EE10 zelená, EE11 černá, EE13 fialová, EE14 bílá, EE15 oranžová, EE16 světle modrá; unikátní haplotypy z Německa – EE4 (Hamburk) červená, EE5 (Hamburk) světle modrá EE6 (Frankfurt) okrová, EE8 (Mnichov) lila, EE9 (Mnichov) olivová, EE12 (Karlsruhe) šedá, EE17 (Mnichov) světle zelená.

*E. roumanicus* se v našich datech vyskytoval v počtu 44 jedinců z České republiky. Nejvíce záznamů bylo v Praze a okolí, kde bylo nalezeno 25 jedinců. Další výskyt byl v oblasti Podyjí, Dolnomoravském úvalu a Ostravské pánvi. Haplotyp ER1, který u tohoto druhu převládá, se vyskytuje na celém popsaném území, západním Slovensku a ve Varšavě. Haplotyp ER7 se v datech vyskytoval pouze 3x, ale s velkým geografickým rozpětím, od Horních Počernic až na střední Slovensko, kde se vyskytuje haplotyp ER6, který je omezen pouze na oblast středního Slovenska a haplotypu ER7 je blízce příbuzný. Na fylogenetickém stromě, vytvořeném metodou

NJ jsou tyto dva haplotypy identické – byl použit algoritmus který nebere v úvahu inserce a delece.

Počet jedinců *E. europaeus* z České republiky v našem datasetu byl 134. Haplotypy EE1, EE2 a EE3 se vyskytovaly na celém území České republiky. Nejširší geografické rozpětí je pozorováno u haplotypu EE2 (od Slezska po střední Německo). Poměrně úzce geograficky omezený byl haplotyp EE14, který se vyskytoval pouze na Moravě a ve Slezsku a jeden záznam pochází ze Slovenska. Jedná se tedy o první genetické ověření *E. europaeus* na území tohoto státu. Haplotypy EE7, EE11 a EE15 se nevyskytovaly na Moravě a ve Slezsku, byly pouze v Čechách a v Německu (EE7 a EE15). Haplotyp EE13 byl omezen pouze na oblast severozápadních Čech a jediným zjištěným haplotypem s výskytem pouze u jednoho jedince v České republice byl EE16 z Plačkova u Humpolce.

V Německu bylo nalezeno několik haplotypů, které se v České republice nevyskytovaly (EE4, EE5, EE6, EE8, EE9, EE12, EE17). Jen v Hamburku se vyskytovaly 3 unikátní haplotypy (EE4, EE5, EE6) a další dva, které byly hojné i v České republice (EE2, EE3). Přestože geografická vzdálenost některých německých lokalit od českých není velká, byla zjištěna větší míra výskytu unikátních haplotypů. Například v Mnichově, cca 150 km vzdáleném, byly nalezeny 3 haplotypy (EE8, EE9, EE17), které se nevyskytovaly nikde jinde na zkoumaném území.

Nejvhodnější model evoluce nukleotidů u *E. roumanicus* a *E. europaeus* ve střední Evropě byl odhadnut za použití Akaikeho kritéria. U druhu *E. europaeus* byl nejvhodnějším substitučním modelem K18uf+I (Kimura 1981), který značí rozdílné frekvence bazí, rozdílné rychlosti transverzí a transicí a přítomnost invariabilních míst. U *E. roumanicus* byl zjištěn model HKY (Hasegawa et al. 1985), kde jsou dvě rychlosti substituce a rozdílné frekvence bazí. Druhy se příliš neliší ve frekvenci jednotlivých bazí (tab.7)

<i>E. europaeus</i>	<i>E.roumanicus</i>
freqA = 0.3397	freqA = 0.3397
freqC = 0.0786	freqC = 0.0786
freqG = 0.1983	freqG = 0.1983
freqT = 0.3835	freqT = 0.3835

**Tab. 7.** Frekvence bazí *E. europaeus* a *E. roumanicus*

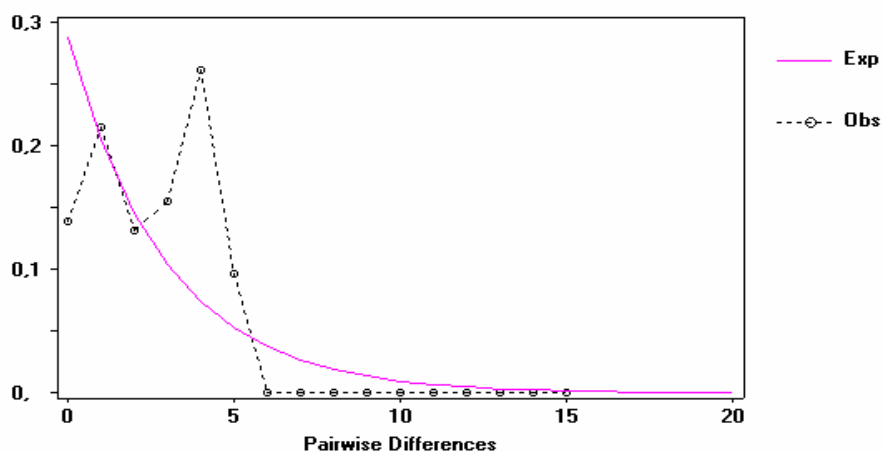


Nukleotidová diverzita byla nízká u obou druhů. Haplotypová diverzita byla u *E. europaeus* poměrně vysoká. Oba parametry byly vyšší u druhu *E. europaeus* (Tab. 8). Testy neutrality byly u *E. roumanicus* nesignifikantní, přesto byly na rozdíl od *E. europaeus* v záporných hodnotách, které naznačují recentní expanzi. Ragedness statistika byla nesignifikantní u obou druhů, což znamená, že v datech nebyla podpora pro dlouhodobě stabilní populaci. Parametr  $\tau$  byl u *E. europaeus* 10x vyšší než u *E. roumanicus*, což znamená, že expanze *E. roumanicus* je mladší.

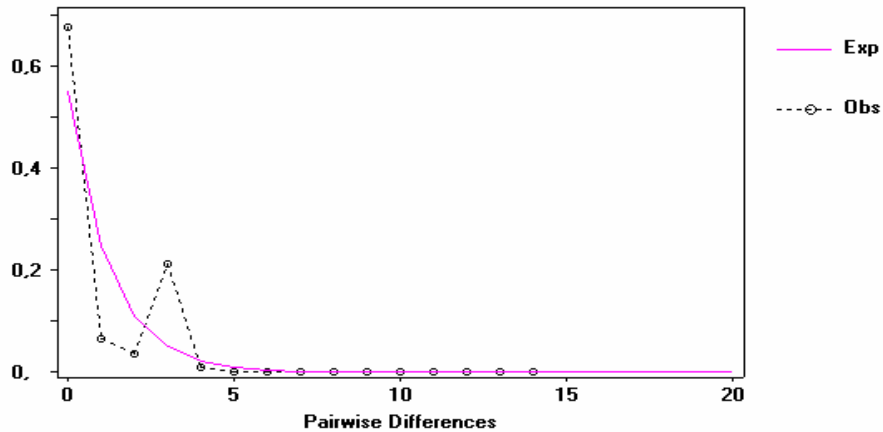
N	N <sub>h</sub>	N <sub>InDel</sub>	N <sub>subs</sub>	$\pi$	Hd	Fu & Li's F*	Fu & Li's D*	Fu's Fs	Tajima's D	rg	$\tau$
54	6	4	5	0,00182	0,298	-0,9804	-0,85999	-0,882	-0,78708	0,4627	4,1
133	10	2	46	0,00611	0,861	1,76622*	1,17076	0,499	2,09875*	0,06873	41,8

**Tab. 8.** Analýza genetické diverzity a testy neutrality *E. europaeus* a *E. roumanicus* z České republiky a Slovenska. Červeně je vyznačen *E. roumanicus* a modře *E. europaeus*. N = počet jedinců, N<sub>h</sub> = počet haplotypů, N<sub>InDel</sub> = počet míst s inverzí či delecí, N<sub>subs</sub> = počet míst, kde došlo k substituční události,  $\pi$  = nukleotidová diverzita, Hd = haplotypová diverzita, rg = ragedness statistika,  $\tau$  = čas expanze měřený v mutačních jednotkách. (\*p < 0,05)

Analýza mismatch distribution také podpořila recentní expanzi u *E. roumanicus*. Graf je v porovnání s *E. europaeus* jednovrcholový (unimodal).

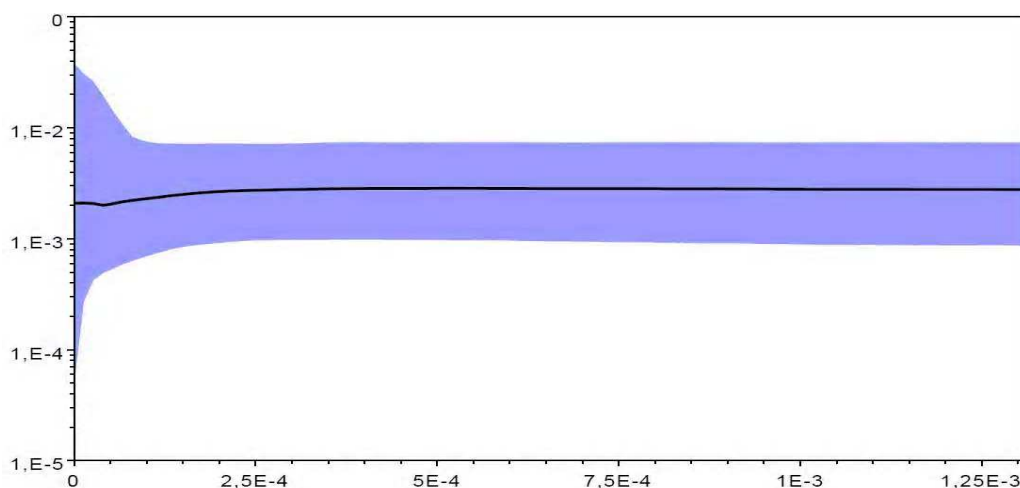


**Obr. 15.** Mismatch distribution pro *E. europaeus*

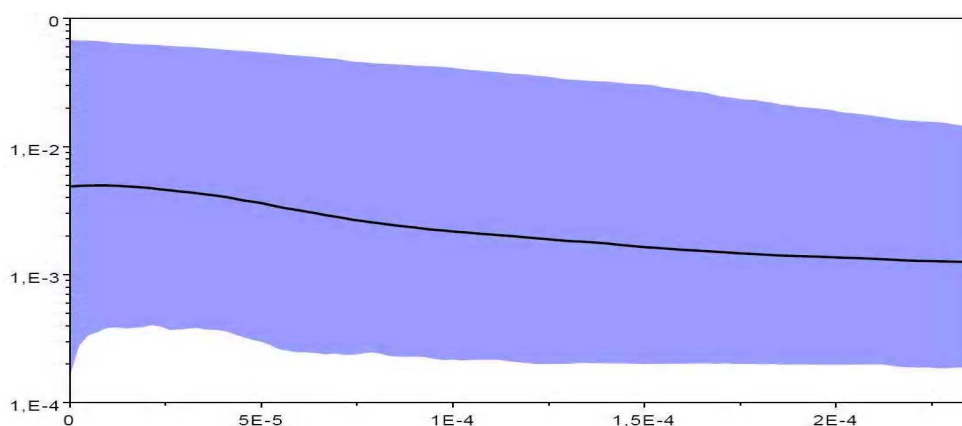


**Obr. 16.** Analýza mismatch distribution pro *E. roumanicus*.

Bayesiánské skyline ploty naznačují, že populační velikost *E. europaeus* byla v nedávné minulosti (do doby koalescence analyzovaných haplotypů) přibližně konstantní. U *E. roumanicus* došlo v tomto časovém úseku (který je zde kratší než v předchozím případě, protože divergence mezi sekvencemi jsou menší) k mírnému (přibližně čtyřnásobnému) nárůstu populační velikosti.



**Obr. 17.** Bayesiánský skyline plot založený na vzorku ( $n = 134$ ) částečných sekvencí kontrolní oblasti mtDNA *E. europaeus*. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti  $N_e\mu$ . Černá linie znázorňuje medián odhadu, hranice modré plochy 95% konfidenční interval.



**Obr. 18.** Bayesiánský skyline plot založený na vzorku ( $n = 54$ ) částečných sekvencí kontrolní oblasti mtDNA *E. roumanicus*. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti  $N_e\mu$ . Černá linie znázorňuje medián odhadu, hranice modré plochy 95% konfidenční interval.

### 3.2. Mikrosatelity

Všech 9 mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních s počtem alel od 2 do 17 (průměrně 10,33) u *E. roumanicus* a od 4 do 22 (průměrně 13,44) u *E. europaeus*. Celková očekávaná heterozygotnost byla vyšší pro *E. roumanicus*, ale pozorovaná heterozygotnost byla naopak vyšší u *E. europaeus* (Tab. 9). Oba druhy se lišily v distribuci frekvencí jednotlivých alel v lokusech (grafy rozložení v příloze), druhově specifických alel s frekvencí vyšší než 0,05 bylo zjištěno 21 u *E. europaeus* a 15 u *E. roumanicus*.

Analýza mikrosatelitového datasetu programem MICRO-CHECKER nezjistila přítomnost chyb v určení genotypů v důsledku výskytu stutter bands ani chyby z důvodu špatné amplifikace velkých alel. Odhadnutá míra frekvence nulových alel se lišila mezi jednotlivými lokusy i mezi druhy (Tab. 10, grafy v příloze). U *E. europaeus* byl signifikantní nedostatek homozygotů oproti simulovaným datům zjištěn ve dvou lokusech (EEU3 a EEU43H) a u *E. roumanicus* bylo nalezeno lokusů šest (EEU5, EEU6, EEU54H, EEU4, EEU3, EEU43H). (Tabulky očekávaných a pozorovaných frekvencí homozygotů k odhadu výskytu nulových alel pro oba druhy k nahlédnutí v příloze).

Analýza testující nedostatek heterozygotů v programu GenePop vyšla signifikantně pro 7 lokusů (EEU5, EEU6, EEU43H, EEU54H, EEU3, EEU4, EEU2) *E. roumanicus* ( $p < 0,01$ ) a 6 lokusů (EEU6, EEU43H, EEU54H, EEU3, EEU4, EEU2) *E. europaeus* ( $p < 0,01$ ). Podle programu Arlequin byly v Hardy-Weinbergově rovnováze 3 lokusy u *E. roumanicus* (EEU2, EEU37H, EEU12H) a 4 lokusy u *E. europaeus* (EEU5, EEU54H, EEU37H, EEU12H). Pouze lokus EEU37 a EEU12H byl v Hardy-Weinbergově rovnováze u obou druhů.

Hodnoty Fis (koeficient inbreedingu) byly v kladných hodnotách (Tab 9.). Celkově bylo Fis vyšší u *E. roumanicus* (0,1768) než u *E. europaeus* (0,0686). Fst (fixační index) byl pro *E. roumanicus* 0,1403 a pro *E. europaeus* 0,1713. Jediným párem lokusů, mezi nimiž byla zjištěna genová vazba, byly EEU2 a EEU37H.

locus	<i>E. roumanicus</i>					<i>E. europaeus</i>				
	rozsah velikosti	počet alel	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	Fis	rozsah velikosti	počet alel	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	Fis
EEU5	117-145	10	0,6391*	0,5082*	0.2203	105-138	9	<b>0,5159</b>	<b>0,4923</b>	0.0458
EEU6	152-174	10	0,8126*	0,6393*	0.2146	144-165	14	0,5301*	0,5038*	0.0497
EEU43H <sup>+</sup>	160-198	16	0,8744*	0,7414*	0.1532	144-174	13	0,6067*	0,4662*	0.1827
EEU54H	281-298	9	0,7193*	0,5333*	0.2602	281-296	12	<b>0,7376</b>	<b>0,7239</b>	0.0170
EEU3 <sup>+</sup>	134-179	17	0,6835*	0,5574*	0.1858	147-165	12	0,7468*	0,6692*	0.1042
EEU4	142-169	10	0,7969*	0,6229*	0.2197	142-168	14	0,8261*	0,7939*	0.0392
EEU2	269-284	13	<b>0,8821</b>	<b>0,7966</b>	0.0976	262-283	17	0,8676*	0,8203*	0.0547
EEU12H	91-93	2	<b>0,0325</b>	<b>0,0328</b>	-	89-95	4	<b>0,1105</b>	<b>0,0923</b>	-
EEU37H	239-248	4	<b>0,6578</b>	<b>0,6066</b>	0.0785	231-278	22	<b>0,7981</b>	<b>0,7538</b>	0.0557
celkově		10,33	0,73175	0,66731	0.1768		13,44	0,68720	0,69498	0.0686

**Tab. 9.** Charakteristiky mikrosatelitových lokusů u *E. europaeus* (n = 131) a *E. roumanicus* (n = 61) v České republice a na Slovensku. Rozsah velikosti, počet alel, H<sub>E</sub> = očekávaná heterozygotnost, H<sub>O</sub> = pozorovaná heterozygotnost, Fis = koeficient inbreedingu. \*odchylka od Hardy-Weinbergerovy rovnováhy (p < 0,05), + pravděpodobný výskyt nulových alel

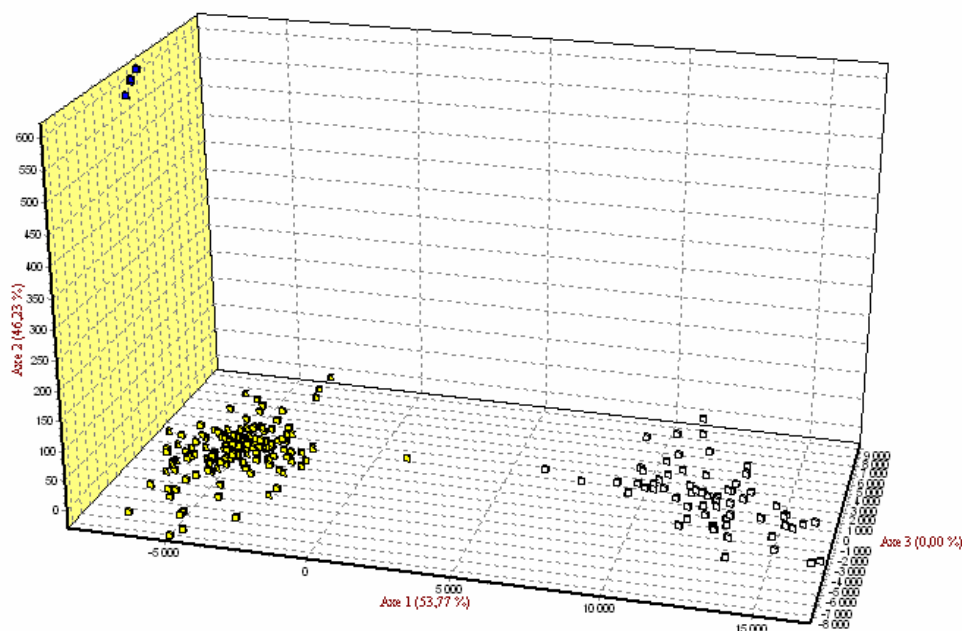
Locus	frekvence nulových alel	
	<i>E. roumanicus</i>	<i>E. europaeus</i>
EEU5	0,0999*	0,0052
EEU6	0,1100*	0,0240
EEU43H	0,0774*	0,0638*
EEU54H	0,1096*	0,0221
EEU3	0,0826*	0,0389*
EEU4	0,0993*	0,0331
EEU2	0,0644	0,0378
EEU12H	0,0000	0,0595
EEU37H	0,0271	0,0164

**Tab. 10.** Odhady frekvencí nulových alel u *E. roumanicus* a *E. europaeus*. \*signifikantní nadbytek homozygotů oproti očekávání zjištěný programem MICRO-CHECKER

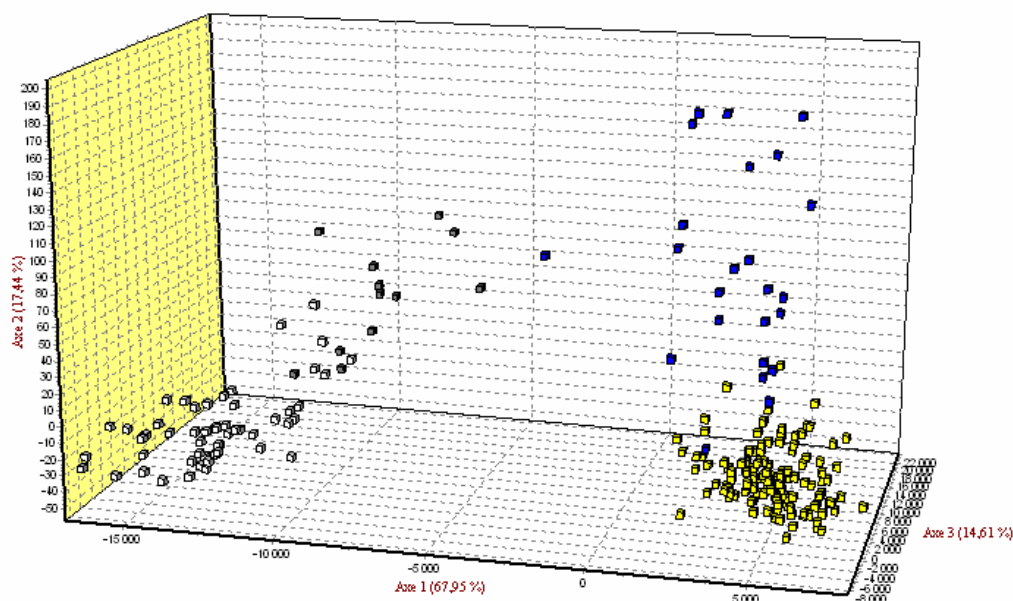
Faktoriální korespondenční analýza umožnila vizualizovat genetické vztahy mezi jednotlivými populacemi. V první analýze byl použit celý dataset pro všechny tři druhy obsažené v našich datech (Obr. 19). Druhy se oddělily do samostatných shluků, které se nepřekrývaly.

Ve druhé analýze byli vyřazeni jedinci druhu *E. concolor* a byly zviditelněny vztahy mezi Českými a zahraničními jedinci druhů *E. europaeus* a *E. roumanicus* (Obr. 20). Shluky mají tendenci ke kontinuálnímu přechodu, ale jedná se pouze o jedince, nepocházející ze zóny sympatrie. Pozici vprostřed mezi oběma druhy zaujímá Sicílie.

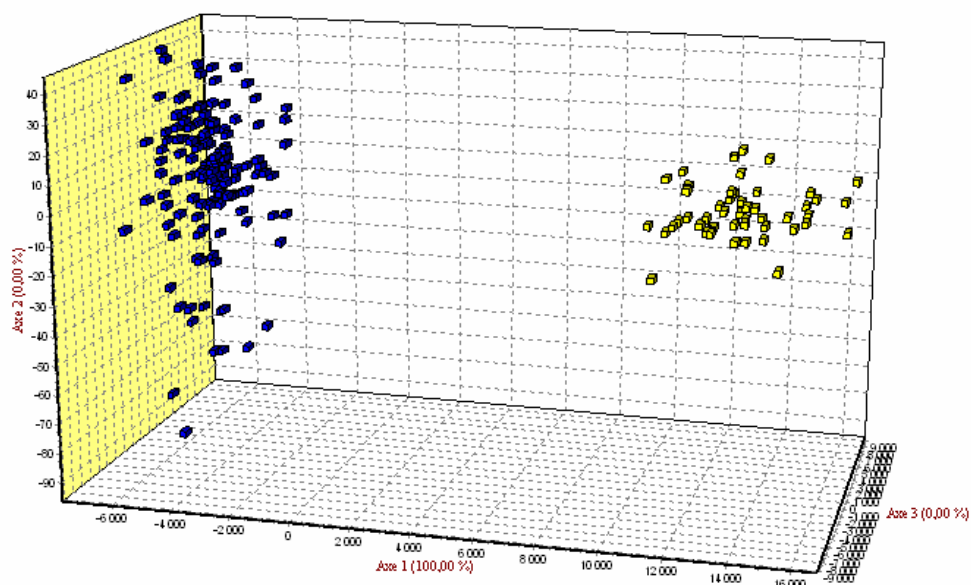
Ve třetí analýze byli ponecháni pouze jedinci z České republiky (Obr. 21). Zde se shluky zcela jasně oddělily a není tendence k překryvu.



**Obr. 19.** Faktoriální korespondenční analýza pro druhy *E. concolor* (modře,  $n = 3$ ), *E. europaeus* (žlutě,  $n = 158$ ) a *E. roumanicus* (bíle,  $n = 65$ ). Na osách jsou první tři hlavní faktory variability.

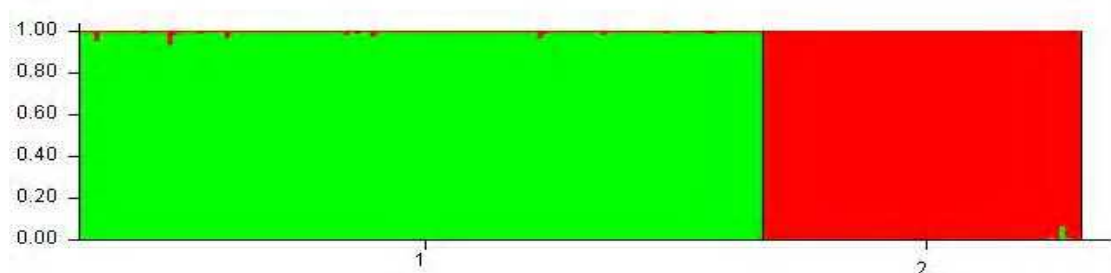


**Obr. 20.** Faktoriální korespondenční analýza pro druhy *E. roumanicus* (n=65) v České republice (bíle) a na Slovensku, Rumunsku a Bulharsku (šedě) a *E. europaeus* (n=158) v České republice (žlutě) a v Německu, Portugalsku a Sicílii (modře).



**Obr. 21.** Faktoriální korespondenční analýza pro druhy *E. roumanicus* (žlutě, n = 49) a *E. europaeus* (modře, n = 130) v České republice.

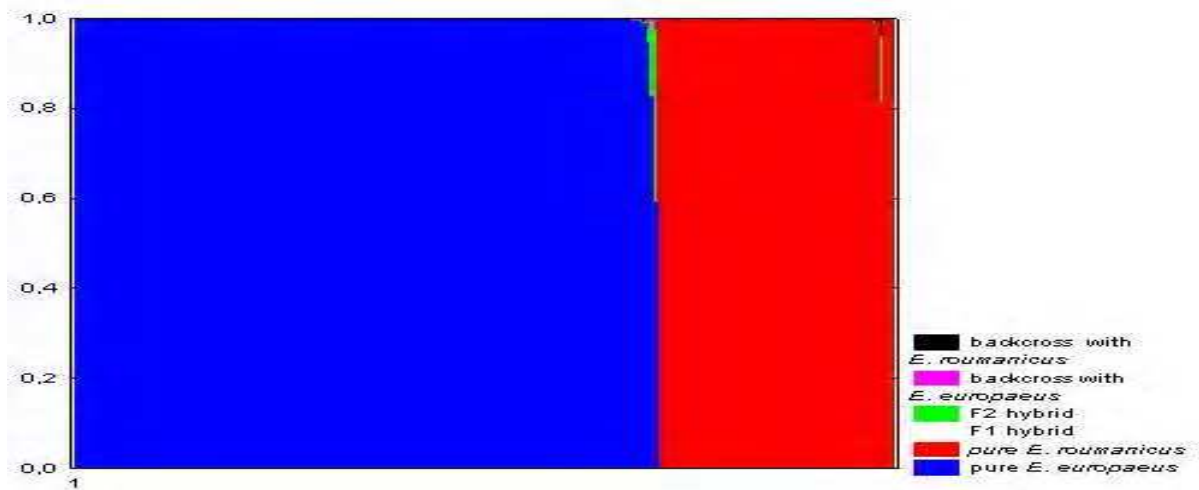
K admixture analýze jsme použili informaci o druhovém zařazení na základě mtDNA ( $K = 2$ ) a v programu STRUCTURE byla odhadnuta pravděpodobnost s jakou každý jedinec patří do předem určeného klastru. U všech jedinců byla zjištěna velmi vysoká pravděpodobnost, že patří do předem určeného klastru ( $q > 0,9$ ). U *E. europaeus* byla průměrná hodnota  $q = 0,995$  a *E. roumanicus*  $q = 0,996$  a hodnota alfa byla 0,0274.



**Obr. 22.** Sloupcový graf výsledků admixture analýzy pro *E. europaeus* (zeleně) a *E. roumanicus* (červeně) v České republice a na Slovensku. Každý jedinec je reprezentován vertikálním sloupcem, jehož délka je proporční k individuálnímu membership koeficientu a je rozdělen na  $K$  barevných segmentů, přičemž v této analýze  $K = 2$ .

Analýza v programu NewHybrids nezjistila přítomnost žádného křížence, všichni jedinci z kontaktní zóny byli zařazeni do kategorie čistý *E. europaeus* nebo čistý *E. roumanicus* s posteriorní pravděpodobností větší než 0,9. Výjimkou byla nižší pravděpodobnost u jedinců ze Sicílie ( $p = 0,59109$  *E. europaeus*), Slovenska ( $p = 0,813$  *E. roumanicus*) a Německa ( $p = 0,825$  *E. europaeus*), v tomto případě se jednalo o artefakt analýzy (jedinci z geograficky vzdálených lokalit mimo sympatrickou zónu).





**Obr. 23.** Výsledky analýzy v programu NewHybrids. Byla použita mikrosatelitová data z 222 jedinců z celého studovaného areálu. Každý jedinec je reprezentován vertikálním sloupcem, délky jeho barevných segmentů jsou proporcionální posteriorní pravděpodobnosti pro příslušnost do jednotlivých hybridních kategorií

## 4. Diskuze

V našich sekvenačních datech jsme zaznamenali výskyt tří druhů ježků rodu *Erinaceus* a všech pěti mitochondriálních linií, které u těchto druhů odpovídají glaciálním refugiím, což dobře koreluje s literaturou (Santucci et al. 1998, Seddon et al. 2001). *E. europaeus* zahrnuje tři mitochondriální linie - z Iberského a Apeninského poloostrova a ze Sicílie. Rozdělení středomediteránního refugia na Apeninské a Sicilské, typické pro ježky, není u jiných skupin obvyklé, detailní biogeografický scénář pro tuto oblast zatím není k dispozici (Seddon et al. 2001). *E. roumanicus*, s refugiem na Balkánském poloostrově a *E. concolor*, z oblasti Malé Asie a části Levanty, tvoří samostatné linie (Seddon et al. 2001, Seddon et al. 2002). V nedávné historii došlo k druhotnému kontaktu ve střední Evropě. Zde se stýká Apeninská linie *E. europaeus* a *E. roumanicus* z Balkánského refugia.

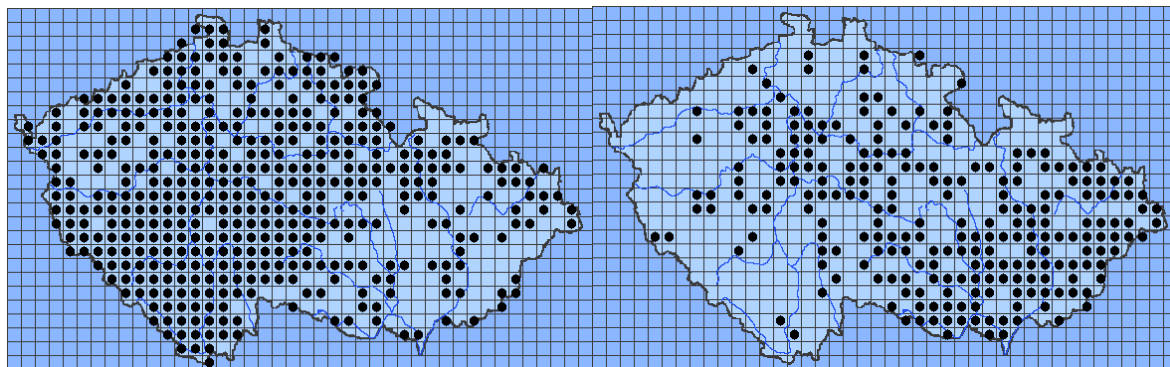
Výsledek genetické práce popisující rozšíření taxonu může být oproti tradičnímu faunistickému mapování zatížen větší statistickou chybou – genetická práce většinou pracuje s nižším *n*, proto neumožňuje tak detailní statistické zpracování dat. Přesto byl v našich datech poměrně znatelný pattern, který naznačuje, že *E. europaeus* je v České republice hojnější (až 3x) a obývá větší škálu prostředí. *E. roumanicus* se v naší studii vyskytoval především v nížinách (Pražská kotlina, Dolnomoravský úval a Ostravská pánev). První systematické faunistické výzkumy na území České republiky, kde je široká zóna sympatrie, byly provedeny Kratochvílem v letech 1966 a 1975. Výše popsáný trend je patrný i v těchto pracích.

Zjištěná absence genetického potvrzení *E. roumanicus* v ostatních oblastech České Republiky se dá interpretovat buď jako skutečná absence druhu, nebo (vzhledem k použitému počtu vzorků) jako řádově nižší populační hustota oproti *E. europaeus* v těchto oblastech. K rozřešení této otázky bude potřeba geneticky zpracovat další vzorky, zejména ty morfologicky určené jako *E. roumanicus*.

Mezi lety 1965 a 1975 se hranice areálu obou druhů posunuly jen velmi málo (obr 5; 6; 7). Po srovnání našich dat s Kratochvílem je u obou druhů patrný posun areálu (u *E. europaeus* na východ, u *E. roumanicus* na západ) v řádech desítek kilometrů. Byl zjištěn výskyt *E. europaeus* na Slovensku. Jedná se o první geneticky ověřený záznam *E. europaeus* na území tohoto státu. Úplně první nález tohoto druhu na Slovensku je z roku 2004 ze Skalice (Kryštofík &

Darolová 2004), což je nedaleko Šaštína, odkud byl jedinec v naší studii. Předchozí práce však určila druh podle morfologických znaků.

V současné době vznikají mapy rozšíření na serveru [www.biolb.cz](http://www.biolb.cz) s přispěním široké veřejnosti a za účasti zoologů (obr. 24). Korelace našich a těchto internetových map není úplná. Zde může hrát roli několik faktorů.



**Obr. 24.** Mapa současného rozšíření *E. europaeus* (vlevo) a *E. roumanicus* (vpravo) v České republice podle serveru [www.biolb.cz](http://www.biolb.cz). Tmavý kruh = stálý výskyt.

Genetické určení druhu je přesnější, než na základě vnějších morfologických znaků. Nejčastěji používané morfologické znaky, podle kterých se živé exempláře v terénu určují do druhu (kresba na hlavě, zbarvení, pruhování a uspořádání bodlin aj.) mohou vykazovat vnitrodruhovou variabilitu a u některých z nich dochází k výrazným změnám v průběhu ontogeneze (např. zbarvení). Z tohoto důvodu může být určení na základě těchto morfologických znaků zatíženo chybou.

Odlišnosti mezi výsledky tradiční faunistiky a genetiky mohou být způsobeny i odlišným způsobem sběru dat. Pro středně velkého savce jakým je ježek není zavedena standardní metoda odchytu jako jsou pasti nebo sítě. Při faunistickém mapování se dá použít například liniová metoda (Reeve 2008), která je však (při distančním určování) vhodná spíše v oblastech, kde nedochází k sympatrickému výskytu více druhů ježků.

Většina našich vzorků pocházela z odběru tkání jedinců uhynulých na silnicích, většinou po srážce s automobilem. Na území České republiky neproběhla žádná podrobnější studie, která by uváděla, kolik ježků ročně uhynie následkem automobilové dopravy. (V materiálech ČSOP je uvedeno, že uhynie 0,2 až 2,8 ks ježků na 1 km silnice) V Holansku proběhlo sčítání a bylo

odhadnuto, že ročně na cestách uhynie 113 000 až 340 000 ježků (Huijser & Bergers 1998), v Belgii pak 230 000 až 350 000 ježků (Holsbeek et al. 1999). Teoreticky by na poměr počtu vzorků obou druhů mohla mít vliv odlišná míra jejich synantropizace – druh, vyskytující se častěji v oblasti lidských sídel by se na silnici mohl vyskytovat častěji. Vzhledem k tomu, že byly zjištěny lokality se syntopickým výskytem obou druhů (Praha - Jižní město, Praha-Kajetánka, Praha-Bohnice, Praha-Trója, Praha-Prosek), nebude tento trend zřejmě příliš silný a nebude se jednat o mikroalopatrii. Navíc pro takovou úvahu není robustní podpora v literatuře (i když tady může hrát roli menší objem znalostí pro *E. roumanicus*). Vliv by mohly mít i odlišnosti v migračním chování a potravních preferencích ovlivňující výskyt ježků na silnicích. Zde narážíme opět na nedostatek dat u *E. roumanicus* ve srovnání s *E. europaeus* (např. radiotracking, potravní ekologie apod.).

Část vzorků pocházela z uhynulých jedinců ze záchranných stanic a ekocenter, kterých je v České republice 26, ale ne všude ježky přijímají. Bylo zjištěno, že na našem území *E. europaeus* hibernuje od října do dubna a *E. roumanicus* od listopadu do března (Kratochvíl 1975), přičemž samice začínají hibernovat později a také se později probouzejí (Reeve 1981, Morris 1969). To by mohlo způsobit častější výskyt jednoho druhu v záchranných stanicích, kdy po naplnění kapacity, často již z během října, nepřijímají další ježky. Důležitou roli mohou tyto záchranné stanice sehrát v šíření ježků. Ne vždy je možné všechny jedince označit a odvézt zpět do místa nálezu, proto často dochází k jejich vypouštění o desítky kilometrů dál, než byla jejich původní lokalita. Tento fenomén nebyl u nás podrobněji studován, otázkou zůstává, jaká je míra jejich disperze po vypuštění, nakolik tyto přesuny ovlivňují populační strukturu a jestli mohou přispět k rychlejšímu posunu hranic areálu.

*E. europaeus* vykazuje větší haplotypovou variabilitu a jeho haplotypová síť je komplexnější v porovnání s *E. roumanicus*, který měl haplotypů méně a převládal jeden, široce zastoupený (ER1). Tento haplotyp byl nalezen v celém zkoumaném areálu druhu, což by mohlo potvrzovat jeho ancestrální pozici. Ostatní haplotypy *E. roumanicus* byly zastoupeny malým počtem jedinců a lišily se několika mutacemi. Haplotypová síť tohoto typu naznačuje star-like phylogeny, která odpovídá recentní expanzi. Haplotyp ER7 byl nalezen v datech pouze u tří jedinců, ale s velkým geografickým rozpětím (Horní Počernice, Vítonice, Cinobaňa). Mohlo by jít o několikanásobný vznik tohoto haplotypu, což by naznačovalo existenci mutačního hotspotu v příslušné oblasti mtDNA.

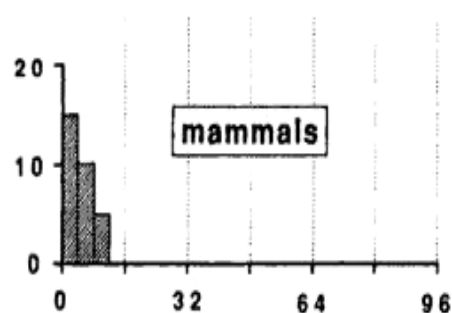
Demografickou historii populací jsme testovali několika přístupy. Testy neutrality sice byly u *E. roumanicus* v záporných hodnotách, které značí expanzi, avšak nebyly signifikantní. Analýza mismatch distribution nebyla jednovrcholová a raggedness statistika nebyla signifikantní. Zdá se, že v datech není podpora pro dlouhodobě stabilní populaci a mohlo k expanzi dojít, signál však není silný. To naznačuje i Bayesiánský skyline plot, který odhadl až čtyřnásobný nárůst populace *E. roumanicus* (od doby koalescence analyzovaných dat), zatímco analýza *E. europaeus* ukázala přibližně stabilní populaci za dobu několiknásobně delší (díky koalescenci sekvencí s většími distancemi). Ani ostatní parametry nedetekovaly v datech známky expanze u tohoto druhu. U *E. roumanicus* bude vzhledem k menší genetické variabilitě potřeba k přesnějšímu rozřešení populační historie více dat (např. při malém počtu haplotypů pracuje skyline plot s malým počtem koalescenčních událostí a důsledkem je nedostatečná statistická podpora výsledků).

Úroveň genetické diverzity v jaderných datech byla o něco vyšší u *E. europaeus* (počty alel, úroveň pozorované heterozygotnosti), což podporuje pattern zjištěný pomocí mitochondriálního markeru. Nicméně zjištěné rozdíly nebyly tak výrazné jako u mtDNA, což se dá interpretovat jako důsledek pomalejší reakce jaderné DNA na proběhlé demografické procesy (4x větší efektivní velikost populace pro diploidní markery). Analýza v programu MICRO-CHECKER neprokázala chyby v genotypování v důsledku výskytu stutter bands nebo špatné amplifikace velkých alel. Lokusy, které vykázaly nedostatek homozygotů oproti simulacím u obou druhů (EEU3 a EEU43H) byly interpretovány jako lokusy s pravděpodobným výskytem nulových alel (v důsledku mutací v místech nasedání primerů). To by u nich mohlo přispět k signifikantním výsledkům testů na odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Příčiny, vedoucí k odchylkám od Hardy-Weinbergovy rovnováhy u jiných lokusů mohou být biologického charakteru. K nejvýznamnějším z těch, které mohou přicházet v úvahu v tomto případě (vzhledem k nadbytku homozygotů a charakteristikám druhu) může patřit porušení předpokladu náhodného křížení (existence populační substrukтуры, přítomnost inbreedingu) a přítomnost selekce (viz např. Page & Holmes 1998).

U ježků se nesetkáváme s výraznou teritorialitou (Boitani & Reggiani 1984, Reeve 1982) ani se semifosoriálním způsobem života, podmínkami, které často vedou ke vzniku genetické diferenciace v menším geografickém měřítku. Nicméně vzhledem k poměrně nízkým migračním schopnostem (Reeve 1982) a fragmentaci habitatů vhodných pro tyto druhy, je Wahlundův efekt

(snížení zastoupení heterozygotů v populaci po jejím rozdělení na větší množství menších subpopulací s reprodukční izolací) pravděpodobným vysvětlením, zvláště při použitém typu vzorkování (z různých demů). Např. Becher et al. (1998) zjistili u *E. europaeus* v oblasti Oxfordu omezení genového toku mezi geograficky blízkými populacemi. Autoři nedošli k jednoznačnému závěru, jestli tento výsledek připsat nízkým disperzním schopnostem druhu jako takového nebo omezením disperze v důsledku existence bariér vytvořených člověkem. Další studie, založené na radio-trackingu, prokázaly, že velké cesty a otevřená pole mohou být významnou bariérou v migračním chování ježků a mohou tak zvyšovat fragmentaci populace (Rondinini & Doncaster 2002).

Odhady pro stáří divergence u *E. europaeus* a *E. roumanicus* se liší - např. Suchentrunk et al. (1998) došli k odhadu 0.4–0.5 miliónu let (Pleistocén), zatímco Seddon et al. (2001) navrhuje pro společného předka pliocénní stáří (3.2–4.5 miliónu let). Tyto odhady spadají do oblasti genetických vzdáleností, kdy se savčí linie dokážou ještě křížit (Avis 1994, obr. 25). Pro oba druhy existuje evidence pro vznik hybridů v zajetí (Herter 1965, Poduschka & Poduschka, 1983) ve volné přírodě hybridů nebyli geneticky prokázáni (Suchentrunk et al. 1997). Existují geneticky neověřené zprávy o pozorování jedinců s přechodnými znaky v přírodě (např. v Anděra & Horáček 2005).



**Obr. 25.** Imunologické distance mezi druhy savců, schopných produkovat životaschopné hybridy (Avis 1994). Osa y - počet druhových párů, schopných produkovat hybridy, osa x – imunologická distance (albumin, 1.7 ID odpovídá 1 miliónu let).

Explorativní analýza sympatrických populací pomocí metody AFC zcela jasně oddělila oba druhy do dvou shluků odpovídajících druhům. Admixture analýza v programu Structure vyloučila recentní genový tok mezi jadernými pooly obou druhů, což bylo potvrzeno přesnější analýzou v programu NewHybrids, kdy se nepotvrdil výskyt žádné ze čtyř hybridních kategorií, které mohou vzniknout během dvou generací. Vzhledem ke zkoumanému počtu zvířat z kontaktní zóny (n = 179) a běžnou frekvencí výskytu hybridních jedinců různých kategorií v hybridních zónách jiných druhů se dá konstatovat, že oba druhy se na území České Republiky

nekříží. Mezi druhy tedy velmi pravděpodobně existuje úplná reprodukčně izolační bariéra, která má (vzhledem k možnosti křížení v zajetí) zřejmě charakter prekopulačních reprodukčně izolačních mechanismů.

Roli by mohla hrát řada faktorů. Prostorové oddělení (mikroalopatrie) vzhledem k zjištění syntopického výskytu zřejmě nepřipadá v úvahu. Možné je jiné načasování období reprodukce (Kratochvíl 1975). Důležité může být vlastní epigamní chování, které je u ježků velmi složité a podrobněji je prostudováno pouze u *E. europaeus*. Před pářením dochází k různým rituálům, při kterých hrají roli akustické signály (ježci funí a samci obíhají samici - Reeve 1981). Důležitou roli hraje olfaktorická komunikace, samci jsou samicemi přitahováni jen při estru, zřejmě díky pachu poševního sekretu. Bylo zaznamenáno rozložení pachových podnětů do několika fází námluv (Poduschka 1969, Poduschka 1977, Poduschka & Poduschka 1986).

Česká republika zaujímá v Evropě výjimečné postavení, na křížovate postglacialních kolonizačních cest mnoha živočišných druhů a dochází zde k sekundárnímu kontaktu linií alopatricky vzniklých během glaciálů (Hewitt 2001). Při alopatrické speciaci vznikají reprodukčně izolační bariéry jako neselektivní vedlejší produkt neutrální evoluce (např. Avise, 2000). Po sekundárním kontaktu tak vzniká celá řada situací, podle hloubky a typu divergence. Pokud reprodukčně izolační mechanismy nejsou ustaveny úplně, dochází po kontaktu ke vzniku hybridních zón mnoha typů, např. mezi kuňkami *Bombina bombina* a *Bombina variegata* (Szymura 1993), myšmi *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* (Macholán et al. 2007), vránami *Corvus corone corone* a *Corvus corone cornix* (Haas et al. 2009). V některých případech teprve po sekundárním kontaktu dochází k úplnému dokončení speciálního procesu (reinforcement). Oba druhy ježků se do kontaktu severně od Alp (západní Polsko, Česká Republika, severní Rakousko) po posledním glaciálu dostali během Boreálu (před 8-9 000 lety, Sommer 2006), v té době se předpokládá dosažení jejich dnešního rozšíření. V severní Itálii se předpokládá dřívější kontakt z důvodu menší vzdálenosti z refugií. V této souvislosti jsou zajímavé posuny areálů, ke kterým zřejmě dochází recentně. Mohly by souviset s dokončením reinforcementu, který by usnadnil vznik oblasti sympatrického výskytu.

## Literatura

- Anděra, M. & Horáček, I. (2005). *Poznáváme naše savce*. Sobotáles, Praha
- Avice, J.C., Arnold, J., Baal, R.M. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.
- Avice, J.C. (1994). *Molecular markers, Natural history and Evolution*. Chapman & Hall, New York
- Avice, J.C. (2000). *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University press, London.
- Bandelt, H.J., Foster, P., Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Bannikova, A.A., Kramerov, D.A., Vasilenko, V.N., Dzuev, R.I., Dolgov, V.A. (2003). DNA polymorphism of *Erinaceus* hedgehogs and *E-concolor* taxon (Insectivora, Erinaceidae). *Zoologičeskij žurnál* 82 (1), 70–80.
- Becher, Griffiths (1998). Genetic differentiation among local populations of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in mosaic habitats. *Molecular Ecology* 7, 1599–1604.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., (2004): Logiciel sous Windows (tm) pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS UMR. 5000. Université de Montpellier II, Montpellier.
- Bennett, K.D. (1997). *Evolution and Ecology: the Pace of Life*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Berggren, K.T., Ellegren, H., Hewitt, G.M., Seddon, J.M. (2005). Understanding the phylogeographic patterns of European hedgehogs, *Erinaceus concolor* and *E. europaeus* using the MHC. *Heredity* 95 (1), 84–90.
- Boitani, L. & Reggiani, G. (1984). Movements and activity patterns of hedgehogs *Erinaceus europaeus* in Mediterranean coastal habitats. *Z. Säugetierk*, 49, 193–206.
- Coard, R. & Chamberlain, A.T. (1999). The nature and timing of faunal change in the British Isles across the Pleistocene/Holocene transition. *Holocene* 9, 372–376.
- Cooper, S. J. B., Ibrahim, K. M., Hewitt, G. M. (1995). Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* 4, 49–60.



- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J.B., Michaux, J.R. (2005). Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, 14:1727–1739.
- Demesure, B., Comps, B., Petit, R.J. (1996). Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 50:2515–1520.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007) "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology* 7:214
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G. (2005). Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 1185–1192.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- Felsenstein, J. (1992). Estimating effective population size from samples of sequences: inefficiency of pairwise and segregating sites as compared to phylogenetic estimates. *Genetical Research* 59, 139–147.
- Flanagan, N., Mason, P., Gosálvez, J., Hewitt, G. (1999). Chromosomal differentiation through an Alpine hybrid zone in the grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Evolutionary Biology*, 12, 577–585.
- Fu, Y. (1997). Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics*, 147, 915–925.
- Goodman, S.J., Barton, N.H., Swanson, G., Abernethy, K., Pemberton, J.M. (1999). Introgression through rare hybridisation: a genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*), in Argyll, Scotland. *Genetics*, 152, 355–371.
- Gramsch, B. (2000). Friesack: Letzte Jäger und Sammler in Brandenburg. *Jahrbuch Römisch–Germanischen Zentralmuseums Mainz* 47, 51–102.
- Haas, F., Pointer, M.A., Saino, N., Brodin, A., Mundy N.I., Hansson, B. (2009). An analysis of population genetic differentiation and genotype–phenotype association across the hybrid zone of carrion and hooded crows using microsatellites and MC1R. *Molecular Ecology*, 18, 294–305.

- Habet, J.C., Schmitt, T. & Müller, P. (2005). The fourth paradigm pattern of postglacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the Marbled White butterfly (Satyrinae, Lepidoptera). *Journal of Biogeography*, 32, 1489–1497.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95–98.
- Hasegawa, M., Kishino, K., Yano, T. (1985). Dating the human–ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160–174.
- Henderson, M., Becher, S.A., Doncaster, C.P., Maclean, N. (2000). Five new polymorphic microsatellite loci in the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *Molecular Ecology*, 9, 1949–1950.
- Herter, K (1935): Igelbastarde (*Erinaceus roumanicus* x *E. europaeus*) Sitzungsber. Ges. Naturforsch. Freunde Berlin, 118–121. (ex Reeve 1984)
- Herter, K. (1965). Hedgehogs, a comprehensive study. Phoenix house.
- Hewitt, G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society*, 58, 247–276.
- Hewitt, G.M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907–913.
- Hewitt, G.M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10, 537–549.
- Hofreiter, M. & Stewart, J. (2009). Ecological Change, Range Fluctuations and Review Population Dynamics during the Pleistocene. *Current Biology* 19, 584–594.
- Holsbeek, L., Rodts, J., Muyldermans, S. (1999). Hedgehog and other animal traffic victims in Belgium: results of a countrywide survey. *Lutra*, 42, 111–119.
- Huijser, M.P. & Bergers, P.J.M. (1998). Platte egels tellen: resultaten van een VZZ–actie. *Zoogdier* 9, 20–25.
- Jaarola, M. & Searle, J.B. (2002). Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, 11, 2613–2621.
- Kimura, M. (1981). Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 78, 454–458.
- King, R.A. & Ferris, C. (1998). Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology* 4, 95–103.

- Korsten, M., Ho, S.Y.W., Davidson J., Pahn, B., Vulla, E., Roth, M., Tumanov, I.L., Kojola, I., Andersone-Lilley, Z., Ozolins, J., Pilot, M., Mertzanis, Y., Giannakopoulos, A., Vorobiev, A.A., Markov, N. Saveljev, A.P., Lyapunova, E.A., Abramova, A.V., Mannil, P., Valdmann, H., Pazetnov, S.V., Pazetnov, V.S., Rokov, A.M., and Saarma, U. (2009). Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage across northern continental Eurasia after the last ice age: a general demographic model for mammals? *Molecular Ecology*, 18: 1963–1979.
- Kratochvíl, J. (1974). Das Stachelkleid des Ostigels (*Erinaceus concolor roumanicus*). *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae Brno*. (N.S.) 8, 1–52.
- Kratochvíl, J. (1975). Zur Kenntnis der Igel der Gattung *Erinaceus* in der ČSSR Insectivora, Mamm.). *Zoologické listy* 24(4), 297–312.
- Krištofík, J. & Darolová, A. (2004). First record of western hedgehog (*Erinaceus europaeus*) from Slovakia. *Biologia, Bratislava, Faunistical notes*, 59/5, 612.
- Kryštůfek, B. (2002). Cranial variability in the Eastern hedgehog *Erinaceus concolor* (Mammalia: Insectivora). *Journal of Zoology* 258, 365–373.
- Macholan, M., Munclinger, P., Sugerková, M., Dufková, P., Bimova, B., Božíková, E., Zima, J., Pialek, J. (2007). Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. *Evolution*, 4, 746–771.
- Morris, P.A. (1969). Some aspects of the ecology of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). Ph.D. Thesis. University of London (ex Reeve 1984).
- Oshida, T., Abramov, A., Yanagawa, H., Masuda, R. (2005). Phylogeography of the Russian flying squirrel (*Pteromys volans*): implication of refugia theory in arboreal small mammal of Eurasia. *Molecular Ecology*, 14:1191–1196.
- Page, R.D.M. & Holmes, E.C. (1998). *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company.
- Poduschka, W. (1969). Ergänzungen zum Wissen über *Erinaceus e. roumanicus* und kritische Überlegungen zur bisherigen literatur über europäische Igel. *Z. Tierphysiology* 26, 761–804.
- Poduschka, W. (1977). Das Paarungsvorspiel des Osteuropäischen Igels (*Erinaceus e. roumanicus*) und theoretische Überlegungen zum Problem männlicher Sexualpheromone. *Zool. Anz. Jena* 199, 187–208.
- Poduschka, W. & Poduschka, C. (1986). Zahnstein, Zahnfleischerkrankungen und 33 Zahnanomalien bei Erinaceinen (Mammalia: Insectivora). *Z. Angew. Zool.* 73, 231–243.

- Poduschka, W. & Poduschka C. (1983): Kreuzungsversuche an mitteleuropäischen Igel. Säugetierkd. Mitt. 3, 1–12.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817–818.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P.J. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Pybus, O.G., Rambaut, A., Harvey, P.H. (2000). An Integrated Framework for the Inference of Viral Population History From Reconstructed Genealogies. *Genetics*, 155, 1429–1437.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J. (2002). Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 2092–2100.
- Reeve, N. (2008). Protocol for standardised hedgehog survey method for local and national surveys.
- Reeve, N.J. (1981). A field study of the hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) with particular reference to movements and behaviour. Ph.D. Thesis, University of London. (ex Reeve 1984)
- Reeve, N.J. (1982). The home range of the hedgehogs as revealed by a radio tracking study. *Symp. Zool. Soc. London* 49, 207–230.
- Reeve, N.J. (1994). Hedgehogs. T & AD Poyser (Natural History): London
- Rondinini, C. & Doncaster, P. (2002). Roads as barriers to movement for hedgehogs. *Functional Ecology*, 16, 504–509.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. (2003). DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496–2497.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Santucci, F., Emerson, B.C., Hewitt, G.M. (19998) . Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs. *Molecular Ecology* 7 (9), 1163–1172.
- Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N., Hewitt, G.M. (2002). Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolutionary Biology* 15 (3), 463–467.

- Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N.J., Hewitt, G.M. (2001). DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* 10 (9), 2187–2198 .
- Schmitt, T. & Seitz, A. (2001). Allozyme variation in *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): identification of ice-age refugia and reconstruction of post-glacial expansion. *Journal of Biogeography*, 28, 1129–1136.
- Schmitt, T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, 4:11.
- Schmitt, T. (2009). Biogeographical and evolutionary importance of the European high mountain systems. *Frontiers in zoology*, 6:9.
- Schneider, S. & Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 3, 1079–1089.
- Sommer, R.S. (2006). When east met west: the sub-fossil footprints of the west European hedgehog and the northern white-breasted hedgehog during the Late Quaternary in Europe. *Journal of zoology*, 273, 82–89.
- Strimmer, K. & Pybus, O. (2001). Exploring the Demographic History of DNA Sequences Using the Generalized Skyline Plot. *Molecular Biology and Evolution*, 12, 2298–2305.
- Suchentrunk, F., Haiden, A., Hartl, G.B. (1998). On biochemical genetic variability and divergence of the two Hedgehog species *Erinaceus europaeus* and *E-concolor* in central Europe. *Zeitschrift für saugetierkunde—international journal of mammalian biology* 63 (5): 257–265.
- Swindell, S.R. & Plasterer, T.N. (1996). SEQMAN: Contig Assembly. *Methods in Molecular Biology*, 70, 75–89.
- Szymura, J.M. (1993). Analysis of hybrid zones with *Bombina*. In: Harrison RG (ed) *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*, Oxford University Press: Oxford. pp 261–289.
- Taberlet, P., Bouvet, J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. *Proc R Soc Lond B*, 255:195–200.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Hausser, J. (1994). Chromosomal versus mitochondrial DNA evolution: tracking the evolutionary history of the southwestern European populations of the *Sorex araneus* group (Mammalia, Insectivora). *Evolution*, 48:623–636.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 8, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Ursenbacher, S., Carlsson, M., Helfer, V., Tegelström, H., Fumagalli, L. (2006). Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 15:3425–3437.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
- Wallis, G.P., Arntzen, J.W. (1989) Mitochondrial-DNA variation in the crested newt superspecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution*, 43:88–104.
- Williams, D., Dunkerley, D., DeDeckker, P., Kershaw, P., Chappell, M. (1998). *Quaternary Environments*, Arnold, London.

**Appendix 1: 410 bp 5' část sekvence pro kontrolní oblast mtDNA (obsahující levou hypervariabilní doménu) pro zjištěné haplotypy**

er01	TGGCCCCGGGGCGAGGAGAGGGGATACTGTTCAACAAGGGTTGTTGTTTCACGTTGAGTTGCTAGATTAAAGAAATAACCTTAATGGAGGTGATATGCGGGTGG
er02	.....C.....
er03	.....
er04	.....
er05	.....
er06	.....
er07	.....
ec01	.....
ec02	.....
ee01	.....C.....A.....
ee02	.....C.....A.....
ee03	.....C.....A.....
ee04	.....C.....A.....
ee05	.....C.....A.....
ee06	.....C.....A.....
ee07	.....C.....A.....
ee08	.....C.....A.....
ee09	.....C.....A.....
ee10	.....C.....A.....
ee11	.....C.....A.....
ee12	.....C.....A.....
ee13	.....C.....A.....
ee14	.....C.....A.....
ee15	.....C.....A.....
ee16	.....C.....A.....
ee17	.....C.....A.....
ee18	.....
ee19	.....A.....
ee20	.....A.....

```

er01 TAGATTAAGTTTATTATAGGATGCCCTATGTACGATCAATA-TTAATATGTACTATGTATAATTATAACCTATAATTGATTGGAATTGAA
er02 .....-.....C.....
er03 .....-.....
er04 .....-.....
er05 .....-.....T.....
er06 .....-.....
er07 .....-.....
ec01 C.....A.....AC.T.....G.....A.....C.....C.....
ec02 C.....A.....AC.T.....G.....A.....C.....C.....
ee01 .....A.....-A.T.....T.....A.AG.....C.....
ee02 .....A.....-A.T.....T.....A.AG.....C.....
ee03 .....A.....-A.T.....T.....A.AG.....C.....
ee04 .....A.....-A.T.....T.....A.AG.....C.....
ee05 .....A.....-A.T.....T.....A.AG.....C.....
ee06 .....A.....-A.T.....T.....A.AG.....C.....
ee07 .....A.....-A.T.....T.....A.AG.....C.....
ee08 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee09 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee10 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee11 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee12 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....
ee13 .....T.....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee14 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee15 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee16 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee17 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....C.....
ee18 .....AA.....-A.T.....T.....A.A.....
ee19 .....A.....-A.T.....T.....A.AG.....
ee20 .....A.....-A.T.....T.....A.A.....

```



```

er01 TTTAATAGATTGTTGATTAAATAATTTAATGTTTTATGTAAATTAGAGTTTAATGTACATGCTTATATGCTAGAAATTACATAAATATATAGTAAATAT
er02 .....
er03 .....
er04 .....T.....G.....
er05 .....T.....G.....
er06 .....T.....G.....
er07 .....T.....G.....
ec01 .....T.....A.....T.....
ec02 .....T.....A.....
ee01 A.....ATC.....A.....G.....A.....
ee02 A.....ATC.....A.....G.....A.....
ee03 A.....ATC.....A.....G.....A.....
ee04 A.....ATC.....A.....G.....C.....A.....
ee05 A.....ATC.....A.....G.....C.....A.....
ee06 A.....ATC.....A.....G.....C.....A.....
ee07 A.....ATC.....A.....G.....A.....A.....
ee08 A.....ATC.....A.....G.....A.....A.....
ee09 A.....ATC.....A.....G.....A.....A.....
ee10 A.....ATC.....A.....G.....A.....A.....
ee11 A.....ATA.....A.....G.....A.....A.....
ee12 A.....ATA.....A.....G.....A.....A.....
ee13 A.....ATA.....A.....G.....A.....A.....
ee14 A.....ATA.....A.....G.....A.....A.....
ee15 A.....ATA.....A.....G.....A.....A.....
ee16 A.....ATA.....A.....G.....A.....A.....
ee17 A.....ATA.....A.....G.....A.....A.....
ee18 A.....ATC.....A.....G.....G.....A.....
ee19 .....ATC.....A.....A.....A.....
ee20 .....ATC.....A.....A.....A.....AG...

```

```

er01 AATTAAATGTCCTTTAGACTATTAAATATTTAAGTGCATATCATTATGGTGTAGTTAATTTAATGTTAGTAGTACATATATGTATACATATATAT--TCAG
er02 .....
er03 .....
er04 .....
er05 .....
er06 .....
er07 .....
ec01 .....
ec02 .....
ee01 .....
ee02 .....
ee03 .....
ee04 .....
ee05 .....
ee06 .....
ee07 .....
ee08 .....
ee09 .....
ee10 .....
ee11 .....
ee12 .....
ee13 .....
ee14 .....
ee15 .....
ee16 .....
ee17 .....
ee18 .....
ee19 .....
ee20 .....

```

er01 GGAATAGTTT  
er02 .....  
er03 .....  
er04 .....  
er05 .....  
er06 .....  
er07 .....  
ec01 .....  
ec02 .....  
ee01 ...G.....  
ee02 ...G.....  
ee03 ...G.....  
ee04 ...G.....  
ee05 ...G.....  
ee06 ...G.....  
ee07 ...G.....  
ee08 ...G.....  
ee09 ...G.....  
ee10 ...G.....  
ee11 ...G.....  
ee12 ...G.....  
ee13 ...G.....  
ee14 ...G.....  
ee15 ...G.....  
ee16 ...G.....  
ee17 ...G.....  
ee18 .....  
ee19 ...G.....  
ee20 .....

Appendix 2: Délky mikrosatelitových alel

	EEU5		EEU6		EEU43H		EEU54H		EEU3		EEU4		EEU2		EEU12H		EEU37H	
	113	115	148	148	151	158	283	285	149	154	147	149	262	271	89	89	242	250
2	113	113	148	148	151	158	283	292	154	154	147	149	262	270	89	89	242	242
3	113	113	148	148	151	158	283	287	147	158	147	155	271	275	89	89	248	274
4	115	115	148	148	151	154	283	290	147	156	147	168	270	270	89	89	248	248
6	113	115	150	158	166	174	287	287	147	165	144	149	270	275	89	93	246	250
11	113	115	150	158	155	164	283	287	147		147	168	270	270	89	89		
12	113	113	148	162	151	151	283	287			147	168	270	270	89	89		
13	113	115	148	148	158	158	283	283	147	154	156	156	268	275	89	89	246	248
15	113	113	148	158	151	153	283	287	156	158	151	158	270	275	89	89	246	277
19	115	115	148	148	158	158	283	287	154	154	155	155	271	282	89	89	231	250
20	113	115	148	150	151	158	283	290	149	156	149	149	271	275	89	89	248	270
23	107	113	148	148	151	151	283	292	147	147	149	155	269	271	89	93	248	248
31	113	115	148	148	151	158	283	285	154	154	149	155	268	277	89	89	246	252
33	113	113	148	158	151	153	281	283	147	156	149	155	275	277			248	248
34	113	138	148	148	153	164	281	287	147	158	149	151	262	275	89	89	246	248
35	113	115	148	158	151	151	287	292	148	148	155	155	271	282	89	89	248	277
36	113	113	148	148	151	151	287	287	147	158	151	153	269	282	89	89	248	250
37	113	115	148	148	151	151	287	290	149	154	144	149	274	277	89	89	246	246
38	113	115	148	158	151	164	282	296	149	154	147	147	266	272	93	93	244	246
39	115	115	148	148	158	164	283	296	154	154	142	149	272	275	89	93	248	250
40	113	115	148	158	158	164	283	287	147	163	149	158	270	280	89	89	250	250
41	113	113	148	164	151	164	283	283	149	154	155	158	275	282	89	89	248	277
42	113	113	148	158	151	158	287	287	150	158	147	149	266	270	89	89	250	250
45	113	113	148	164	151	151	287	287	152	154	155	155	270	275	89	89	246	250
49	113	113	148	148	151	151	287	287	154	154	147	149	266	271	89	91	248	250
50	113	115	148	158	151	151	281	290	154	154	149	149	264	264	89	89	248	258
51	113	115	148	158	151	151	287	287	152	154	147	149	266	271	89	89	246	250
54	113	115	148	148	151	151	283	287	154	154	144	158	268	273	89	89	250	274
55	107	113	148	158	153	153	283	287	149	154	149	155	275	280	89	89	248	250
57	113	113	148	150	151	151	281	287	147	149	155	155	270	275	89	89	246	250
60	115	115	148	164	151	151	287	289	147	154	155	158	262	275	89	89	246	248
61	113	115	148	148	151	151	283	290	147	156	149	149	271	275	89	89	246	250
62	113	113	148	148	151	151	283	287	149	154	149	155	270	271	89	89	248	270

63	113	115	148	150	151	151	285	287	156	163	149	155	275	275	89	89	246	248
64	113	113	148	150	151	151	287	290	147	154	158	168	275	275	89	89	246	248
66	113	117	150	150	151	151	290	292	147	154	149	155	271	282	89	89	246	248
67	113	117	148	158	151	151	287	290	147	156	149	151	268	282	89	89	246	278
68	113	113	148	148	151	151	283	290	147	147	149	155	262	270	89	89	246	278
69	107	113	148	150	151	153	287	287	147	154	146	149	275	282	89	89	246	248
70	113	115	148	148	158	164	283	287	154	154	149	156	272	276	89	89	246	248
71	107	113	148	148	151	151	283	287	154	156	149	151	275	282	89	89	246	252
72	113	113	148	148	151	151	287	287	158	158	149	155	275	282	89	89	276	278
73	113	113	148	150	151	153	281	287	147	158	147	168	270	275	89	89	246	246
74	113	113	148	148	151	151	283	287	147	147	155	160	270	280	89	89	246	278
77	113	113	148	148	151	158	283	287	149	156	149	160	268	270	89	89	248	248
78	107	113	148	158	151	151	283	287	147	154	147	155	271	275	89	89	246	252
79	113	113	148	150	164	164	283	287	156	158	149	155	271	282	89	89	246	250
83	113	115	148	148	151	158	283	290	154	154	147	149			89	89	248	250
86	113	115	158	164	151	151	287	290	154	156	149	158	268	275	89	89	248	248
87	107	113	148	164	151	151	287	287	149	149	147	155	264	275	89	89	248	248
88	107	113	148	150	151	164	287	292	154	154	149	155	262	270	89	89	250	270
89	113	113	148	148	151	151	285	290	152	154	144	147	268	275	89	89	248	252
90	113	113	148	148	151	151	281	283	147	147	149	151	270	275	89	89	246	246
91	115	115	148	160	153	158	283	290	147	158	144	155	262	275	89	93	248	248
92	113	115	148	150	151	164	290	290	152	154	155	160	275	282	89	89	246	274
93	113	115	148	150	153	158	287	289	152	154	155	158	268	275	89	89	248	252
94	105	113	148	148	151	164	283	287	154	159	147	149	272	276	89	93	248	250
95	113	113	148	148	151	151	283	287	147	147	151	153	280	282	89	89	248	278
97	113	115	148	158	144	153	283	285	147	154	142	149	268	268	89	89	246	248
100	113	128	148	148	151	151	287	287	156	156	149	149	264	268	89	89	254	270
102	113	115	148	150	158	166	287	290	154	160	149	149	266	275	89	89	248	250
103	113	113	150	159	151	154	287	287	154	154	149	155	262	275	89	89	248	252
104	113	113	148	148	151	151	287	290	154	154	151	164	262	268	89	89	248	250
105	113	113	148	148	151	153	287	290	154	154	149	153	271	275	89	89	248	248
106	113	115	150	150	151	164	283	287	149	154	144	149	271	275	89	89	246	246
107	113	113	148	148	151	153	281	287	147	158	147	155	275	275	89	89	246	248
108	113	117	148	148	153	158	283	292	147	149	155	155	262	275	89	89	246	250
109	113	117	148	148	151	153	283	287	154	156	147	149	275	275	89	89	246	248

110	107	113	148	150	151	164	291	291	149	154	155	155	275	275	89	89	248	250
114	115	115	148	150	151	151	290	290	149	154	149	155	262	275	89	93	248	248
115	113	113	148	148	153	158	290	290	154	154	147	149	262	275	89	89	246	254
118	115	115	150	158	153	158	287	290	154	154	151	155	262	275	89	89	250	250
119	113	113	148	158	151	151	287	292	147	149	158	160	275	282	89	89	248	254
120	113	117	148	158	164	164	283	287	154	154	155	155	275	271	89	89	250	250
122	113	115	148	150	164	164	287	290	147	156	155	155	275	282	89	89	250	250
125	113	113	158	165	151	151	283	290	147	154	155	155	262	275	89	89	246	278
127	107	115	148	148	151	151	283	292	147	154	155	158	271	275	89	89	246	248
128	113	113	148	148	151	151	287	287	147	149	147	168	266	273	89	89	248	270
130	113	113	148	158	158	158	283	290	147	154	147	158	262	262	89	89	250	250
133	113	113	156	158	151	151	283	287	154	154	155	155	262	270	89	89	250	250
134	113	113	148	150	151	158	287	293	147	147	149	151	262	262	89	89	253	278
137	113	113	150	159	151	153	290	292	154	154	149	151	275	183	89	89	250	253
138	107	113	148	148	151	158	283	285	154	156	149	155	270	282	89	89	248	250
140	113	113	148	148	153	168	287	292	147	154	155	168	266	271	89	89	248	250
141	113	117	148	150	151	151	283	287	147	156	149	155	272	272	89	89	248	248
145	113	115	148	152	151	168	283	290	156	160	155	168	269	271	89	89	248	248
146	113	115	148	152	168	168	283	290	154	154	155	155	271	275	89	89	246	274
148	113	113	148	165	151	151	283	287	149	154	144	149	268	282	89	89	250	277
150	107	113	148	162	151	151	283	283	154	154	144	160	270	275	89	89	248	250
151	113	113	148	162	151	151	281	281	154	154	144	160	270	275	89	89	248	248
152	113	113	148	148	151	151	281	283	154	154	144	155	270	275	89	89	248	250
153	107	113	148	162	151	158	283	283	154	154	144	155	262	280	89	89	248	250
154	113	113	148	162	151	158	281	281	154	154	144	155	262	275	89	89	248	250
155	113	113	148	148	151	151	287	287	149	156	144	147	262	262	89	93	250	252
156	113	117	148	148	151	158	281	287	149	156	147	149	266	266	91	95	248	250
157	113	115	148	148	151	151	283	287	149	154	149	155	262	269	89	91	248	279
159	113	113	150	150	151	151	283	283	149	154	144	147			89	89	238	252
160	113	113	148	148	151	153	283	292	147	156	151	160	270	275	89	89	246	250
161	111	113	148	148	151	153	281	287	154	154	147	149	271	271	89	89	246	248
162	113	115	148	150	151	151	287	290	147	154	149	155	275	275	89	89	248	278
163	111	113	148	148	151	151	290	290	156	156	149	155	262	275	89	89	246	246
165	113	113	148	164	151	151	283	283	154	154	149	158	271	275	89	89	246	246
166	113	113	148	158	158	158	287	290	147	147	149	168	262	275	89	89	246	248

167	113	115	148	148	151	151	287	287	154	154	156	156	273	275	89	89	250	278
169	113	113	148	148	151	151	290	290	154	154	155	168	262	272	89	89	231	268
180	113	117	148	150	151	151	287	287	154	156	149	149	262	266	89	89	248	248
181	115	115	148	158	153	158	283	287	154	154	144	149	277	281	89	89	237	246
182	115	115	148	158	151	166	287	287	154	156	149	155	272	272	89	89	246	248
184	113	113	161	161	151	158	287	294	154	156	144	162	275	277	89	93	248	248
185	113	113	148	148	144	151	283	287	147	156	146	155	270	275	89	89	268	270
187	113	113	150	150	151	151	287	290	158	158	153	155	262	275	89	89	258	270
188	113	113	148	150	151	151	283	287	154	156	147	155	262	280	89	89	246	248
189	113	113	148	148	151	151	281	283	154	163	147	155	262	262	89	89	246	248
190	113	113	148	162	151	164	287	287	154	154	147	162	271	273	89	89	248	270
191	115	138	148	150	151	151	287	290	154	154	147	147			89	89	248	248
192	113	113	144	148	151	164	283	287	152	158	149	149	266	268	89	89	237	246
193	113	115	150	150	151	153	283	283	154	154	147	153	273	273	89	93	242	248
194			148	148	151	151	287	287	147	160	153	153	268	274	89	89	248	248
195	113	117	144	151	148	148	287	287	152	154	147	153	274	277	89	89	246	248
196	113	115	148	148	153	158	287	290	147	154	153	162	266	273	89	89	248	251
197	107	115	148	150	151	151	285	290	152	154	144	160	268	270	89	89	248	248
199	115	115	148	148	164	166	283	283	147	149	153	155	270	282	89	89	246	248
201	113	117	148	148	144	151	287	287	147	149	149	155	270	282	89	89	246	248
202	113	117	148	148	144	151	287	287	147	154	149	155	270	280	89	89	246	260
203	113	113	148	158	158	164	283	287	154	156	149	155	272	272	89	89	246	278
204	107	113	148	148	151	158	287	287	147	147	146	146	270	275	89	89	242	250
205	107	113	151	153	150	165	283	287	147	154	147	155	275	283	89	89	248	274
208	119	138	148	158	151	158	281	292	147	154	149	158	270	274	89	89	240	252
210	113	113	148	148	151	164	281	281	147	158	155	168	262	275	89	89	246	252
211	107	113	148	148	151	151	283	292	154	154	147	147	275	282	89	89	250	278
212	113	113	148	148	151	153	281	287	147	148	149	160	270	275	89	89	248	248
213	113	113	148	148	151	153	281	287	147	158	155	155	275	275	89	89	248	279
215	113	113	148	148	151	151	287	292	147	154	160	160	270	275	89	89	231	252
216	113	113	148	150	151	153	287	292	154	156	149	155	270	272	89	89	248	248
217	113	113	148	148	151	153	283	292	154	156	153	155	272	275	89	89	246	248
ger434	113	113	148	164	151	151	283	283	152	169	149	153	266	277	89	89	237	248
ger436	113	117	148	164	151	158	283	287	147	154	147	151	268	273	89	89	248	248
ger437	115	117	148	148	144	146	290	290	154	165	149	158	273	275	89	89	237	248

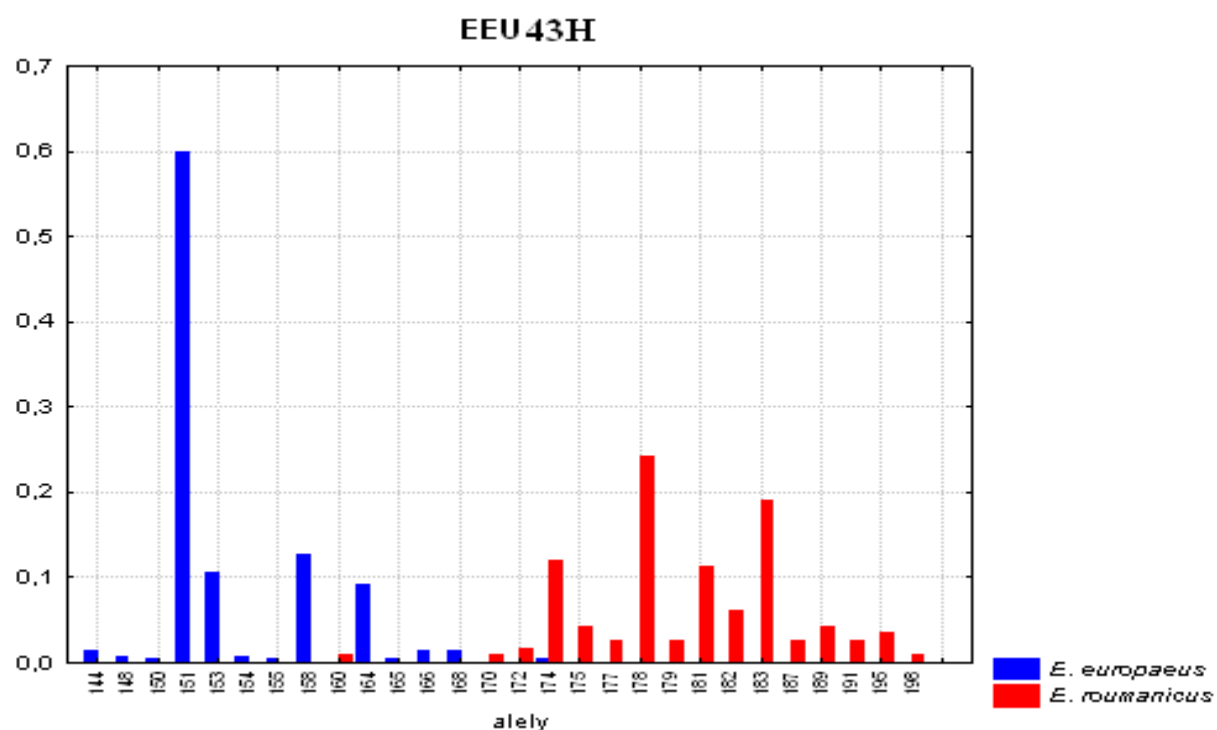
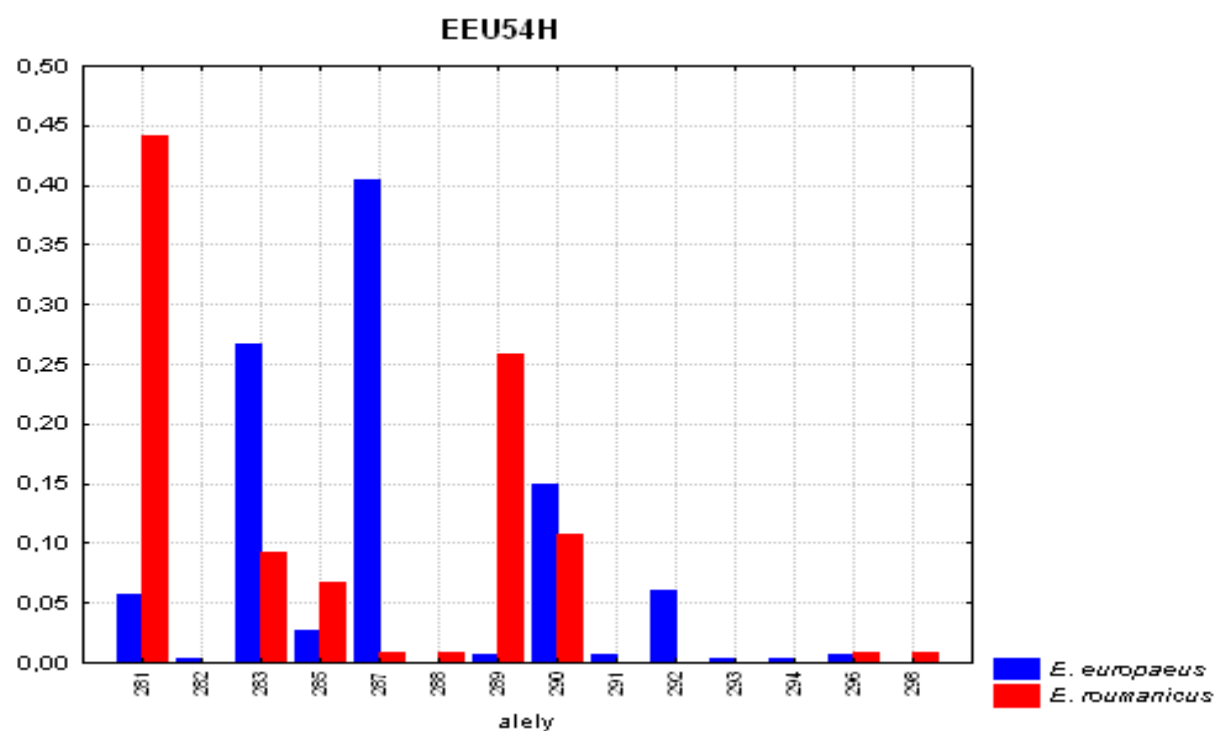
ger439	113	138	148	148	151	172	283	285	147	156	147	160	275	275	89	93	242	250
ger440	113	123	150	162	153	170	283	290	149	173	144	170	169	271	89	89	254	254
ger441	113	113	148	158	151	174	285	290	154	156	147	162	268	273	89	93	238	242
ger442	113	125	148	148	151	172	283	285	158	171	153	160	273	277	91	91	242	242
ger443	113	138	148	148	172	174	283	283	156	158	160	160	275	277	89	95	242	246
ger444	113	113	148	148	146	151	285	285	154	154	160	160	270	275	89	89	242	246
ger446	109	113	148	156	146	151	283	283	156	159	147	160	270	275	91	95	242	258
ger447	117	119	148	148	164	164	283	283	154	156	147	162	266	270	95	95	248	252
ger448	113	113	148	150	162	162	283	287	154	154	151	153	266	266	89	89	246	246
ger449	113	115	148	148	166	168	290	293	154	163	160	168	273	275	89	89	237	262
ger450	113	115	148	148	151	158	290	292	154	156	144	151	270	277	89	89	254	254
ger451	107	115	148	154	158	176	283	283	150	150	144	168	273	273	89	93	246	279
ger452	113	113	148	148	153	166	287	290	149	154	153	155	270	270	89	93	246	262
ger453	127	137	148	148	151	162	283	285	149	159	153	160	270	275	92	92	243	248
ger454	109	113	148	156	146	151	283	283	147	158	158	160	270	275	89	93	242	242
ger455	113	119	151	151	148	158	283	283	147	154	160	168	262	262	89	95	246	246
ger456	111	119	148	148	151	153	283	283	154	156	144	160	271	277	93	93	237	270
pt	115	115	150	150	166	168	290	292	136	136	155	166	273	273	93	93	274	274
sci	117	128	154	154	174	174	287	287	147	156	149	151	280	280	89	89	246	246
sk18	113	113	148	165	153	164	283	283	154	156	144	149	271	271	89	89	242	246
1	117	130	162	164	174	178	281	281	143	143	149	158	270	281	91	91	244	246
5	117	132	162	164	178	178	281	289	143	152	142	155	270	277	91	91	248	248
7	130	136	164	164	177	182	289	289	143	143	149	155	270	277	91	91	246	248
8	130	130	160	160	177	189	281	289	143	143	155	158	277	280	91	91	248	248
9	130	130	158	166	172	174	281	281	143	175	149	149	270	269	91	91	246	248
10	117	130	162	164			281	289	143	169	142	149	270	277	91	91	246	248
14	127	127	162	164	181	189	281	281	167	169	155	158	275	282	91	91	246	248
16	130	136	158	164	174	174	281	289	143	143	158	158	270	270	91	91	246	246
17	117	117	164	164	172	178	289	289	143	143	149	151	271	280	91	91	244	246
18	134	134	166	166	178	178	281	289	143	175	142	155	277	282	91	91	244	248
21	130	136	158	164	174	178	283	289	143	143	158	158	269	277	91	91	244	246
22	130	136	158	164	183	187	281	290	143	143	151	151	269	280	91	91	246	246
24	130	132	158	160	178	183	283	289	143	143	142	155	273	279	91	91	244	248
25	130	132	164	168	174	283	289	289	143	143	142	142	270	274	91	91	246	248
26	130	130	158	162	178	178	283	289	143	143	142	155	277	282	91	91	244	246

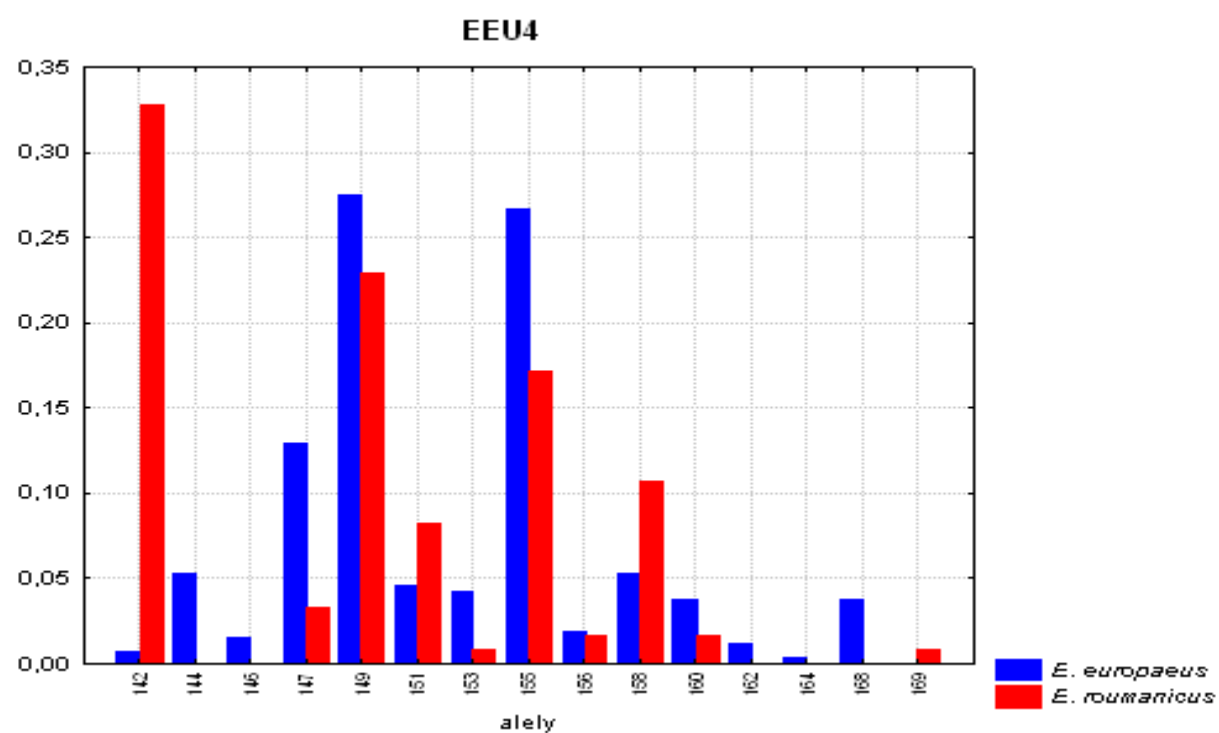
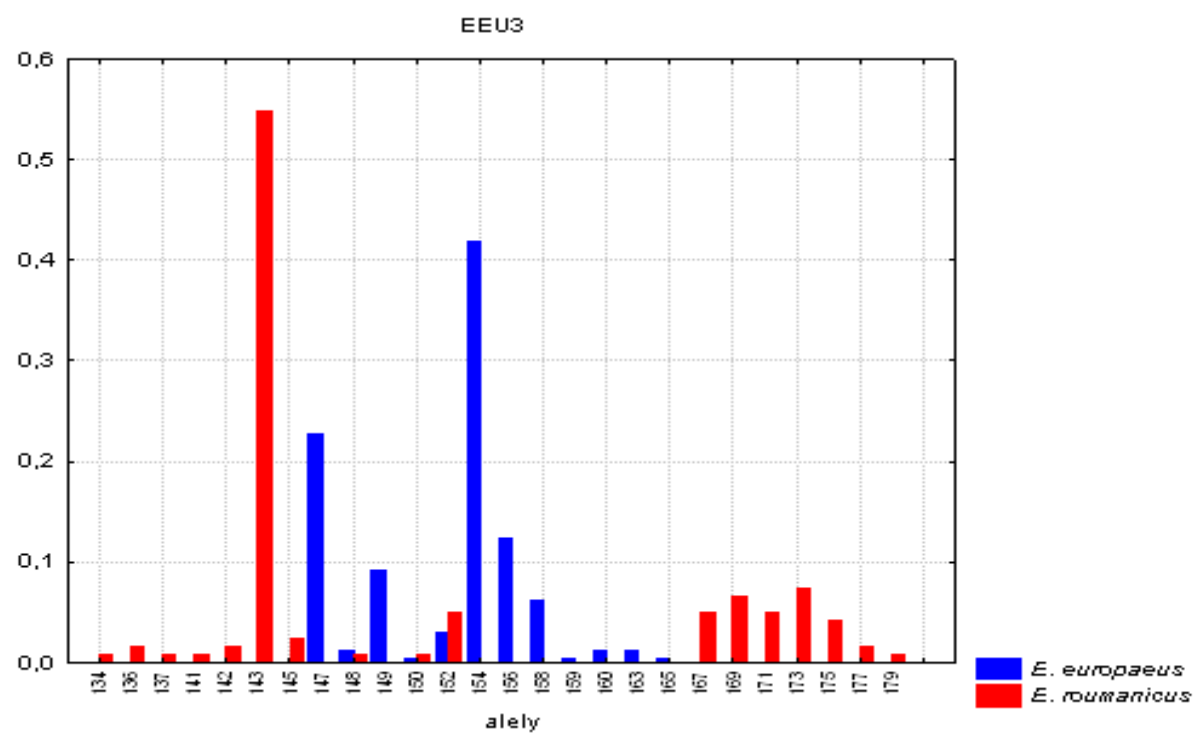


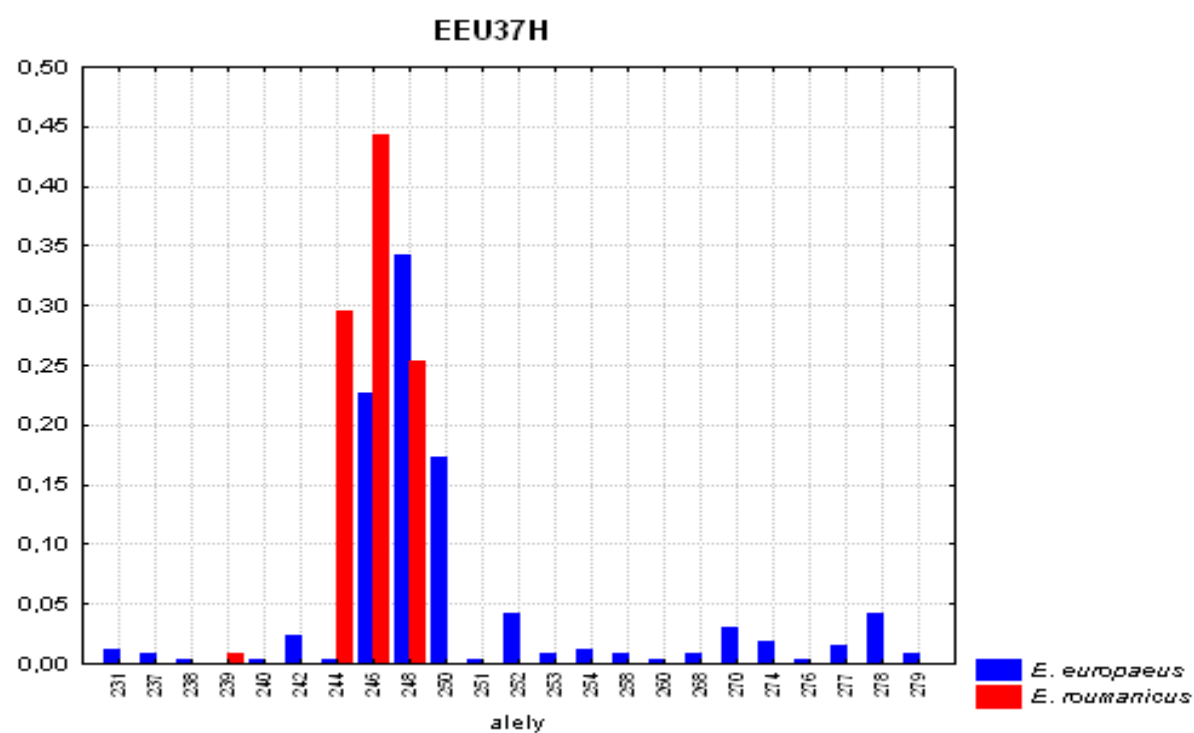
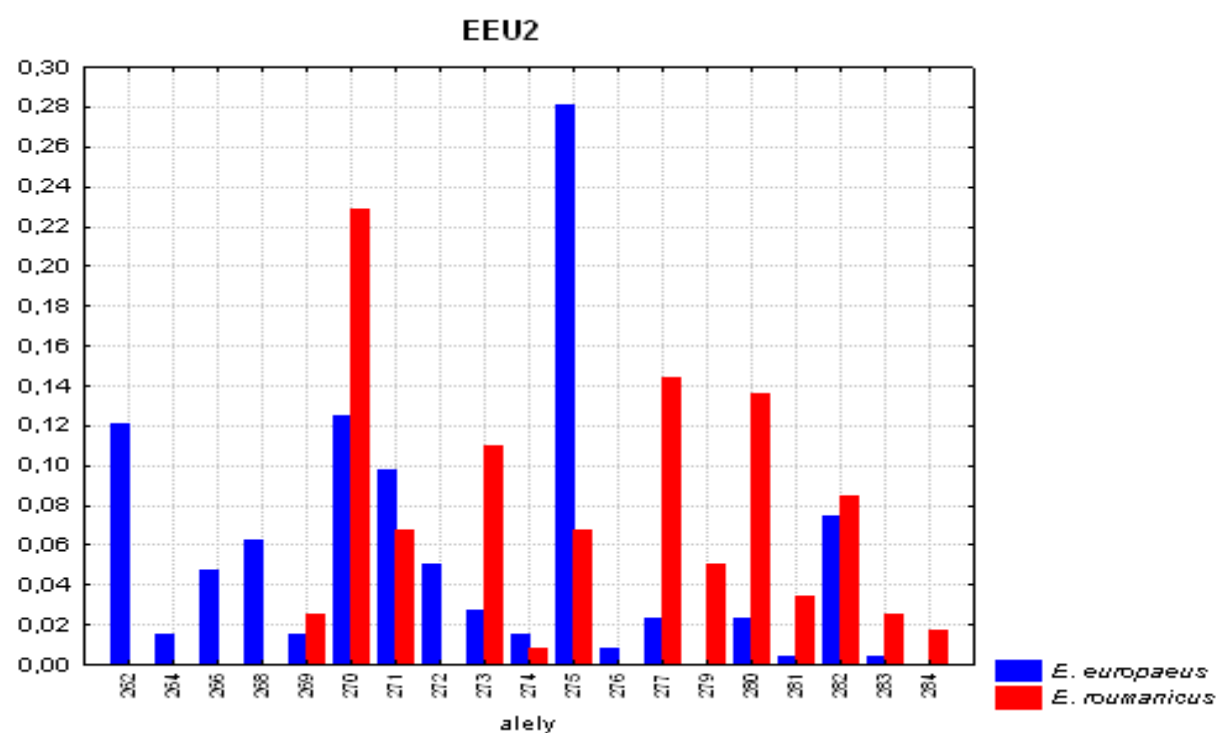
27	117	130	158	168	174	182	289	289	143	173	142	149	270	270	91	91	246	248
28	130	130	159	160	178	182	281	289	143	143	142	149	271	280	91	91	244	244
29	117	132	166	166	183	183	290	290	143	173	142	158	273	273	91	91	244	248
32	130	130	160	166	182	182	281	281	145	169	142	142	270	275	91	91	244	246
43	130	130	160	168	178	178	281	281	141	143	142	142	277	279	91	91	246	246
44	117	130	160	164	178	181	281	281	143	143	142	155	271	279	91	91	246	246
47	117	117	164	166	178	195	281	285	143	143	142	151	280	282	91	91	246	246
58	130	132	158	160	189	191	289	290	143	175	149	151	283	283	91	91	246	246
59	130	132	158	160	178	191	289	290	143	143	142	149	282	282	91	91	244	246
84	136	136	158	158	178	181	283	289	143	169	158	158	277	280	91	91	246	246
85	130	130	164	164	178	181	285	285	143	143	142	158	279	280	91	91	246	248
96	130	136	164	166	170	181	283	283	143	143	142	149	270	275	91	91	244	244
98	130	130	158	160	174	178	281	283	143	152	155	155	275	277	91	91	244	244
101	130	130	158	160	174	178	281	283	143	143	149	149	270	270	91	91	239	244
111	130	130	160	166	179	179	285	285	143	143	151	155	271	273	91	91	244	244
112	117	130	164	164	179	183	281	289	143	173	149	155	271	280	91	91	244	244
113	117	136	174	174	174	195	281	289	143	173	149	156	270	281	91	91	244	246
116	130	130	158	158	178	195	281	283	143	173	142	142	270	282	91	91	244	246
117	117	117	160	166	174	178	281	289	143	143	142	151	270	271	91	91	244	246
121	130	130	160	164	183	195	285	289	143	167	142	155	281	283	91	91	244	248
123	130	130	166	166	178	182	289	289	143	173	142	142	271	280	91	91	244	248
124	130	130	162	164	183	183	289	289	143	143	142	142	270	273	91	91	246	246
126	130	130	166	166	183	183	289	289	143	173	142	149	284	284	91	91	246	246
129	130	130	160	160	174	183	281	290	143	143	149	149	270	273	91	91	248	248
135	130	138	158	166	175	175	281	298	145	145	169	142	280	280	91	91	244	246
139	128	130	159	165	175	175			143	171	142	149			91	91	248	248
142	130	130	160	160	178	178	281	281	143	143	142	142	270	280	91	91	246	248
144	130	130	160	164	189	191	281	290	175	175	142	151	270	282	91	91	246	248
147	130	136	158	164	160	174	281	281	143	167	158	158	273	277	91	91	244	248
149	130	130	164	164	174	183	283	289	134	137	149	151	277	282	91	93	244	248
164	130	130	158	164	178	187	288	290	142	142	149	149	280	280	91	91	244	246
168	130	130	158	160	178	182	281	290	143	171	142	142	279	281	91	91	244	248
183	130	130	158	158	187	189	281	281	143	169	149	149	270	279	91	91	246	248
209	130	132	158	158	181	181	281	296	150	169	142	156	270	270	91	91	246	246
214	130	130	164	166	178	181	281	281	143	173	142	155	270	273	91	91	246	246

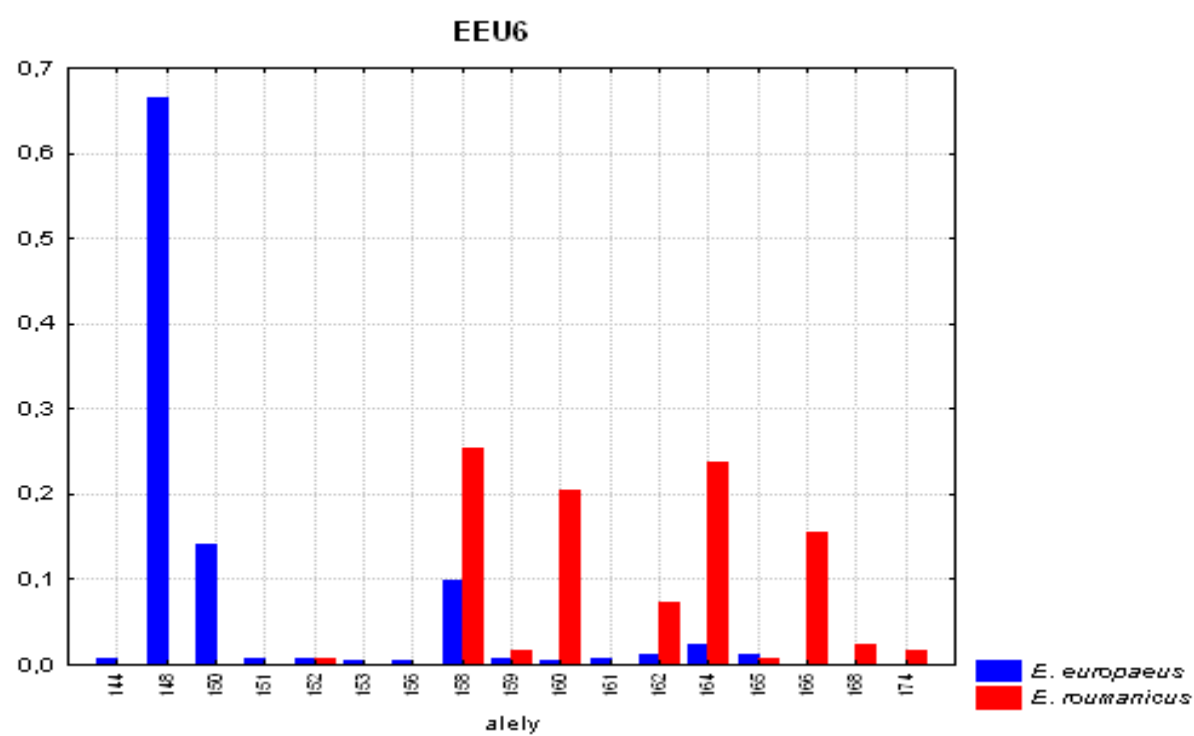
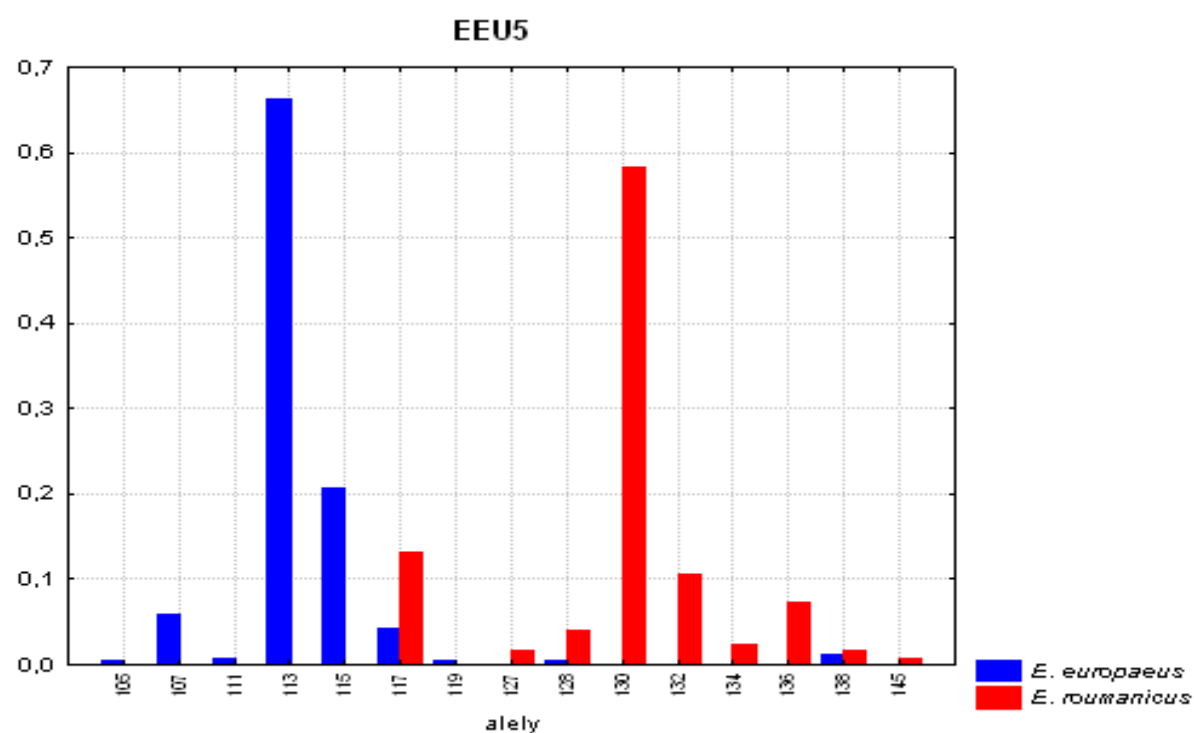
blg	119	138	158	164	174	183	281	294	150	171	151	158	277	279	91	98	244	246
rmn2	130	138	158	160	176	181	285	285	143	143	147	155	273	282	85	91	244	246
rmn3	116	130	159	161	181	181	286	286	143	169	155	155	266	271	91	91	246	248
pl	130	134	168	168	179	183	281	281	143	175	155	155	273	277	93	93	246	246
sk7	117	132	160	160			281	281	136	171	142	155	275	277	91	91	246	248
sk8	132	134	158	164	181	183	285	290	136	177	151	155	273	275	91	91	246	246
sk9	117	130	158	166	181	183	281	281	152	152	147	155	270	277	91	91	244	244
sk10	130	132	158	158	181	183	281	281	167	171	155	155			91	91	248	248
sk11	132	138	160	160	181	183	290	290	177	179	142	142	277	277	91	91	244	246
sk12	130	145	158	158			281	285	148	152	149	160	270	277	91	91	246	246
sk13	128	128	162	166	181	183	281	290	167	173	149	149	271	275	91	93	244	246
sk14	128	132	160	166	183	183	283	287	152	167	147	160	273	273	91	91	246	248
sk15	128	130	158	152	177	183	281	281	169	171	147	153	273	280	91	91	244	246
sk16	130	130	158	164	175	183	281	281	169	171	147	149	275	280	91	91	246	248
sk17	130	132	162	162	183	189	281	281	143	143	155	155	273	282	91	91	244	246

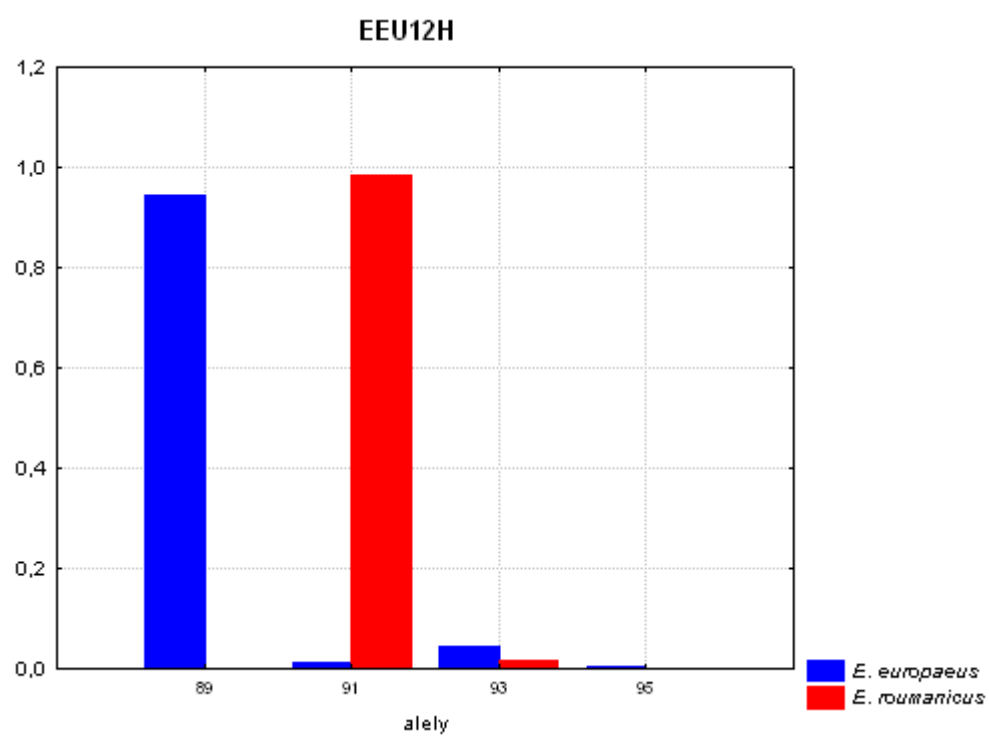
### Appendix 3: Distribuce frekvencí alel v jednotlivých lokusech







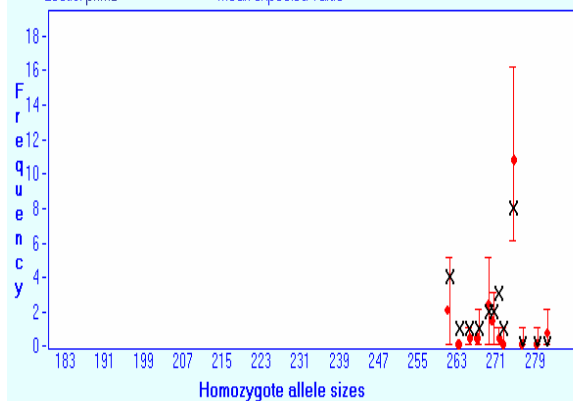




## Appendix 4: Porovnání pozorované a očekávané frekvence homozygotů

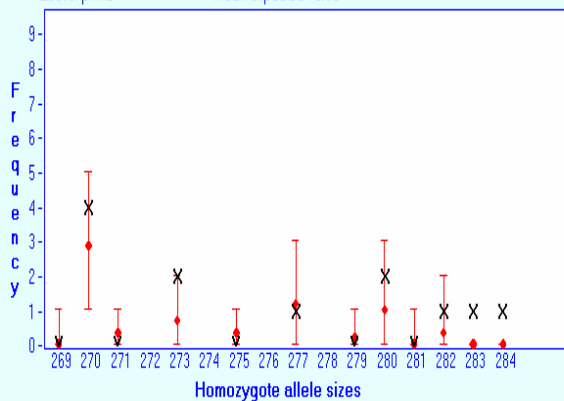
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. europaeus  
Locus: prim2



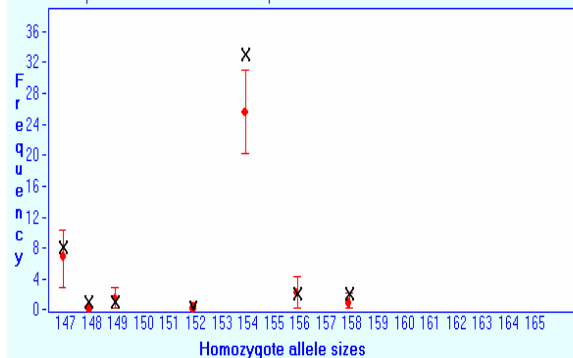
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. roumanicus  
Locus: prim2



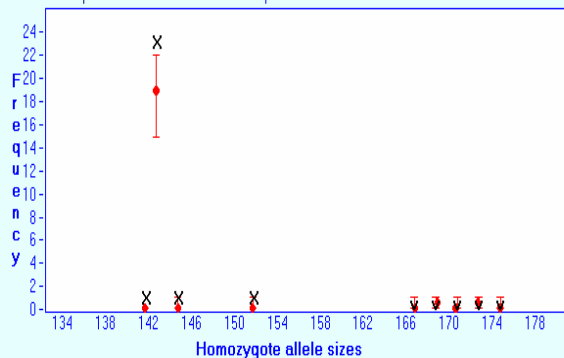
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. europaeus  
Locus: prim3



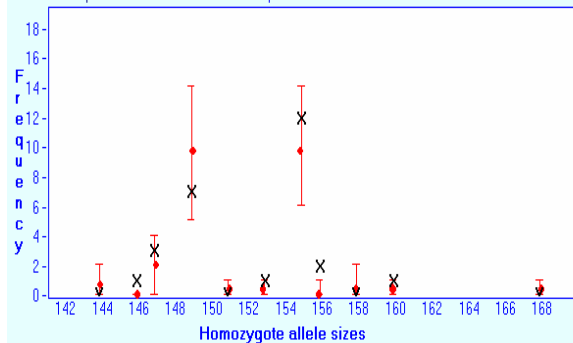
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. roumanicus  
Locus: prim3



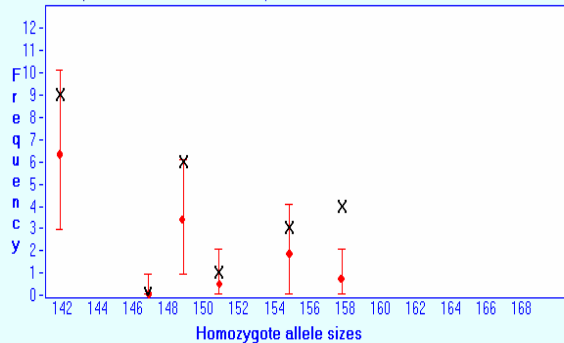
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. europaeus  
Locus: prim4

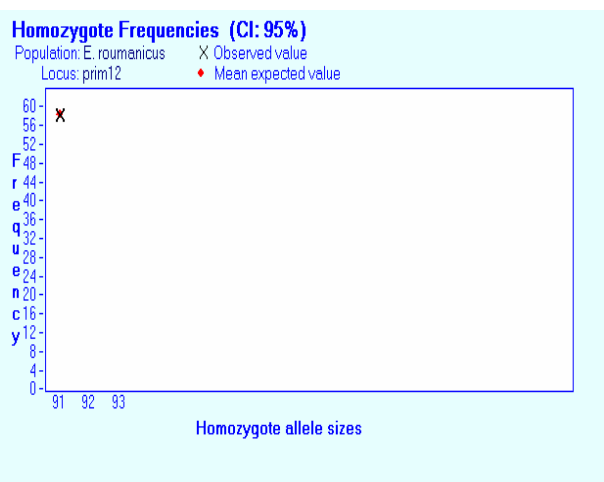
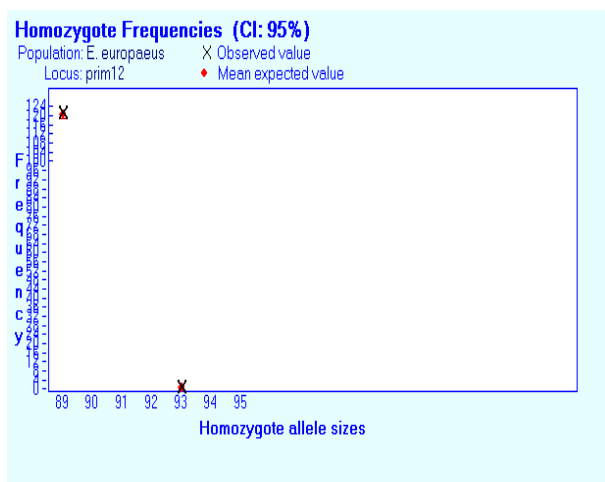
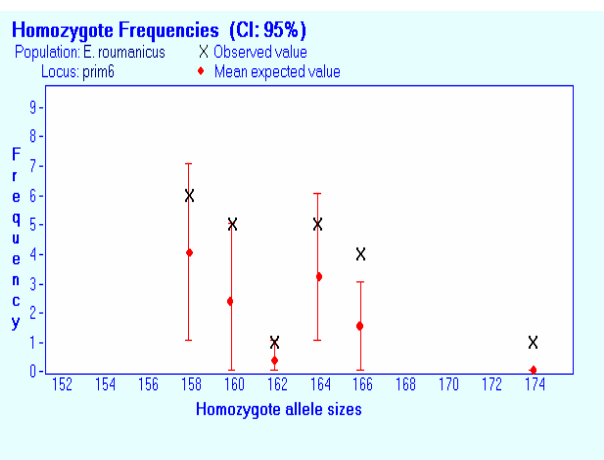
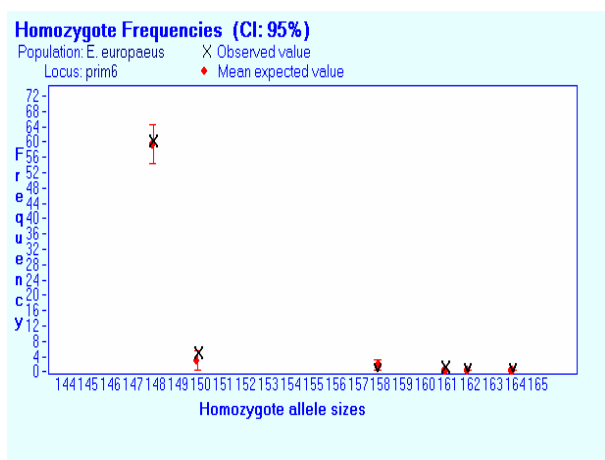
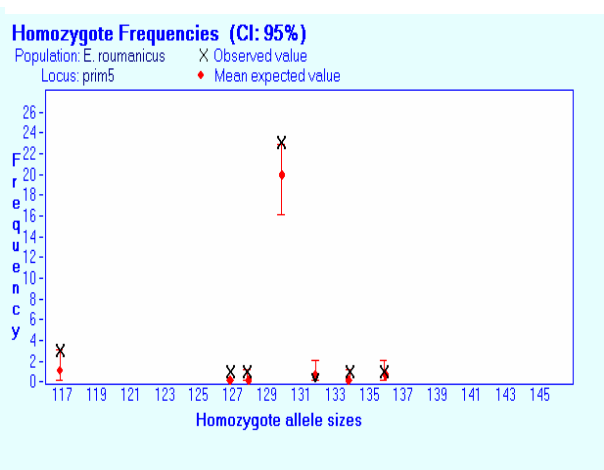
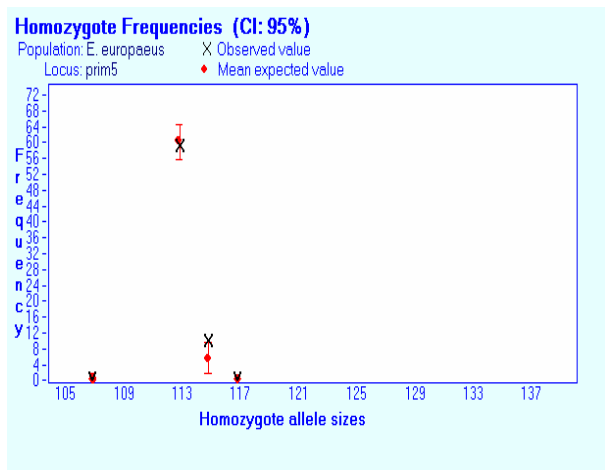


### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. roumanicus  
Locus: prim4

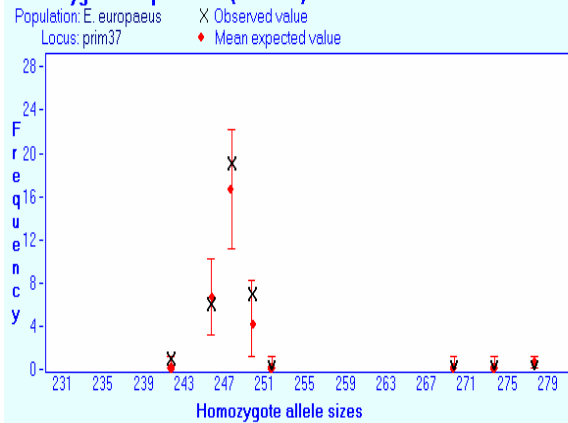






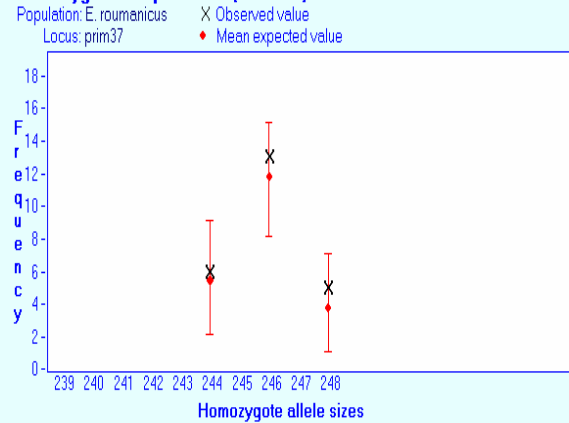
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. europaeus  
Locus: prim37



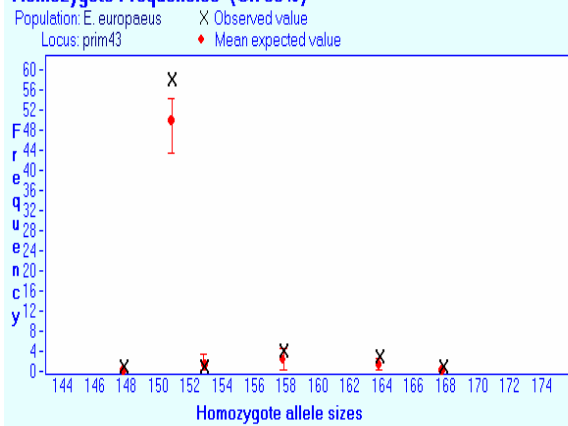
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. roumanicus  
Locus: prim37



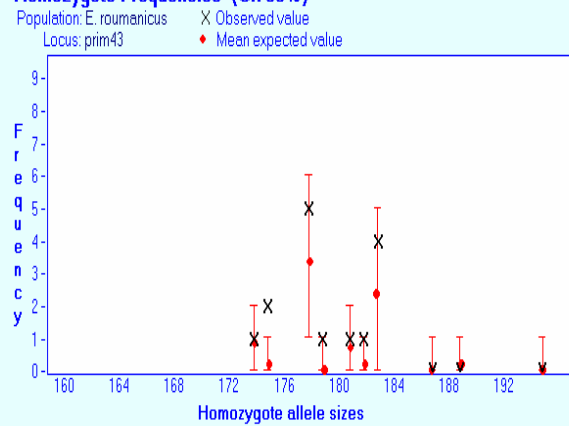
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. europaeus  
Locus: prim43



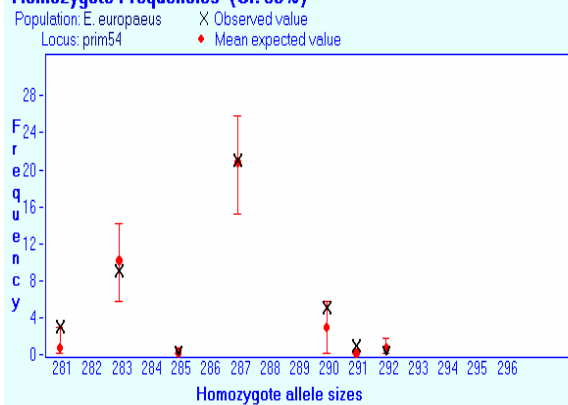
### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. roumanicus  
Locus: prim43



### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. europaeus  
Locus: prim54



### Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: E. roumanicus  
Locus: prim54

